Chlorhaltige Metabolite aus Streptomyceten, Chloractinomycine und Chlorisoflavone

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt

von

CHRISTA KRAUSS

geb. Kurz

aus Calw

1977

77 274

Chlorhaltige Metabolite aus Streptomyceten, Chloractinomycine und Chlorisoflavone

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt

von

CHRISTA KRAUSS

geb. Kurz

aus Calw

1977

Tag der mündlichen Prüfung:		28.4.1977
Dekan	:	Prof.Dr.D.Ammermann
1. Berichterstatter	:	Prof.Dr.H.Zähner
2. Berichterstatter	:	Prof.Dr.V.Braun

Gesamtherstellung: aKu–Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung danke ich Herrn Professor Dr. H. Zähner.

Herrn Professor Dr. W.A. König, Universität Hamburg, möchte ich für die Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Chlorisoflavone sowie für die Überlassung der Spektren und deren Interpretation danken.

Herrn Professor Dr. W. Keller-Schierlein, ETH Zürich, und Herrn Professor Dr. E. Katz, Georgetown University, Washington, danke ich für Untersuchungen an den Chloractinomycinen.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Müller, Ciba-Geigy AG, Basel, und Herrn P.D. Dr. Zeeck, Universität Göttingen, für die Bereitstellung von Genistein.

Herrn K. Wusch danke ich für das Zeichnen der Abbildungen.

Allen Mitarbeitern möchte ich für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche Anregungen danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0083

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien	4
2.2.	Nährmedien	6
2.3.	Organismen	9
2.3.1.	Bakterienstämme	9
2.3.2.	Pilzstämme	10
2.4.	Impfmaterial von Streptomyceten	10
2.5.	Kulturbedingungen für Ansätze in Kolben	11
2.6.	Test auf lipophile chlorhaltige Metabolite	11
2.6.1.	Anzucht der Stämme	11
2.6.2.	Extraktion mit Äthylacetat	11
2.7.	Quantitative Bestimmungen	12
2.7.1.	Chloridbestimmung	12
2.7.2.	Messung des Einbaus von ^{36}Chlor in extrahierbare Verbindungen	12
2.7.3.	Dünnschichtscanning	13
2.7.4.	Photometrische Bestimmungen	13
2.7.5.	Plattendiffusionstest	13
2.7.6.	Verdünnungsreihentest	14
2.7.7.	Test auf antifungische Wirkung	14
2.7.8.	Bestimmung der Isoflavonoide	14
2.8.	Herstellung von ^{36}Chloractinomycinen	15
2.8.1.	Anzucht von Tü 39	15
2.8.2.	Anzucht von Tü 61	15
2.8.3.	Aufarbeitung und Reinigung	16
2.9.	Herstellung von Chlorisoflavonen	16
2.9.1.	Anzucht von Tü 6 im Kolben	16
2.9.2.	Anzucht von Tü 6 im 10 l-Fermenter	16
2.9.3.	Aufarbeitung und Reinigung	17
2.9.4.	Herstellung ^{36}Chlor-markierter Isoflavone	17
2.10.	Isolierung der Isoflavone aus Sojamehl	18
2.11.	Chlorierung von Genistein in synthetischem Medium	18

		Seite
2.12.	Methoden zur chemischen und physikalischen Charakterisierung	18
2.12.1.	Dünnschichtchromatographie	18
2.12.2.	Autoradiographie	19
2.12.3.	UV-Spektren	19
2.12.4.	IR-Spektren	20
2.12.5.	Massenspektren	20
2.12.6.	^{1}H-NMR-Spektren	20
2.13.	Biologische Charakterisierung durch Bioautographie	21
3.	E R G E B N I S S E	22
3.1.	Extrahierbare chlorhaltige Metabolite aus Streptomyceten	22
3.1.1.	Screening	22
3.1.2.	Die Produktion der chlorhaltigen Substanzen	24
3.1.3.	Kriterien für die Auswahl der weiter bearbeiteten Stämme	29
3.2.	Chloractinomycine	30
3.2.1.	Prüfung verschiedener Actinomycinproduzenten auf Chloreinbau	31
3.2.2.	Vergleich der Chloractinomycine aus Tü 39 und Tü 61	34
3.2.2.1.	Produktion	34
3.2.2.2.	Charakterisierung	34
3.2.3.	Optimierung der Chloractinomycinproduktion bei Tü 39	37
3.3.	Chlorisoflavone	38
3.3.1.	Herstellung der Chlorisoflavone	39
3.3.1.1.	Optimierung der Aufarbeitung	39
3.3.1.2.	Aufarbeitung und Reinigung	40
3.3.2.	Charakterisierung und Strukturaufklärung	44
3.3.2.1.	Farbreaktion mit $FeCl_3$	44
3.3.2.2.	UV-Spektren	44
3.3.2.3.	IR-Spektren	44
3.3.2.4.	Massenspektrometrische Untersuchungen	47
3.3.2.5.	NMR-Untersuchungen	53

		Seite
3.3.3.	Antibiotische Eigenschaften	55
3.3.4.	Herkunft der Isoflavone	56
3.3.5.	Hydrolyse der Isoflavonglycoside durch Tü 6	57
3.3.6.	Chlorierung der Isoflavone durch Tü 6	57
3.3.6.1.	Einfluß der Chloridkonzentration	57
3.3.6.2.	Einfluß der Belüftung auf die Chlorierung	59
3.3.6.3.	Zeitpunkt der Chlorierung	60
3.3.6.4.	Chlorierung von Genistein in synthetischen Nährmedien	61
3.3.7.	Umsetzung der Isoflavone in Nährlösung 1 durch andere chlorierende Streptomyceten	63
4.	D I S K U S S I O N	64
4.1.	Eignung des Tests für ein Screening auf Antibiotika	64
4.2.	Die isolierten Substanzen	65
4.2.1.	Chloractinomycine	65
4.2.2.	Chlorisoflavone	67
4.3.	Chlorierung als mikrobielle Transformation	69
4.4.	Chlorstoffwechsel	72
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	74
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	76

1. E I N L E I T U N G

Pharmaka mit den verschiedensten Wirkungen enthalten Chlor (Chivers, 1975; Meyers et al., 1975). Bei manchen sind chlorierte Verbindungen günstige Ausgangsprodukte, bei anderen dient Chlor als schützender oder dirigierender Substituent bei der Synthese. In sehr vielen Substanzen ist aber das Halogen selbst an der pharmakologischen Wirkung beteiligt. Dabei sind sterische und elektronische Effekte von Bedeutung, aber auch physikalische Eigenschaften spielen eine Rolle (Korolkovas, 1974).

Der Atomradius von Chlor ist mehr als dreimal so groß wie der von Wasserstoff; man kann sich vorstellen, daß die Substitution eines Wasserstoffatoms durch Chlor Wechselwirkungen einer Verbindung mit Rezeptoren oder Enzymen entscheidend beeinflußt.

Durch seine drei freien Elektronenpaare kann ein Chlorsubstituent einen negativen induktiven Effekt und einen positiven Mesomerieeffekt auf das Molekül ausüben und die Reaktionsfähigkeit benachbarter Gruppen verändern.

Von den physikalischen Eigenschaften ist die Lipidlöslichkeit und die Flüchtigkeit der Chlorverbindungen von Bedeutung für die Pharmakodynamik. So ist z.B. Clindamycin nicht nur viel wirksamer, sondern wird auch dreimal so schnell resorbiert wie sein chlorfreies Analoges, das Lincomycin, das an der entsprechenden Stelle eine Hydroxylgruppe trägt (Magerlein et al., 1966).

Lipidlöslichkeit und Flüchtigkeit sind auch verantwortlich für die Wirkung chlorierter Substanzen auf das Zentralnervensystem - Narkotika, Hypnotika, aber auch Herbizide und Insektizide gehören hierher. Die Toxizität solcher Verbindungen hängt mit ihrer Affinität zum Fettgewebe und der Blockierung des normalen Abbaus durch den

Chlorsubstituenten zusammen (Kuschinsky und Lüllmann, 1972).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Chlorsubstitution die Wirkung von Pharmaka entscheidend verändern oder auch erst hervorrufen kann.

Neben den vielen Chemotherapeutika haben auch einige chlorhaltige Naturstoffe mit antibiotischer Wirkung Eingang in die Medizin gefunden. Bei ihnen treten natürlich auch die oben genannten Effekte auf und manchmal sind diese Antibiotika wesentlich wirksamer als ihre chlorfreien Analogen. Das gilt auch für die drei bekanntesten: Chloramphenicol, Chlortetracyclin und Griseofulvin (Hahn, 1967; Ringrose und Lambert, 1973; Reedy et al., 1955; MacMillan, 1954). Dabei kann der Wirkort chlorierter Antibiotika ganz verschieden sein (Laskin, 1967; Huber, 1975; Jordan und Reynolds, 1975; Pestka, 1975).

Die bedeutendsten Antibiotikaproduzenten sind Streptomyceten; daher schien es aussichtsreich, bei der systematischen Suche nach chlorierten Produkten dieser Mikroorganismen neue Wirkstoffe zu finden. Zudem konnte man Auskunft darüber erwarten, wie häufig chlorierte Metabolite bei diesen Organismen vorkommen. Die Notwendigkeit, nach neuen Antibiotika und mikrobiellen Produkten mit anderen biologischen Wirkungen zu suchen, ist an anderer Stelle erörtert worden (Zähner, 1976). Dort wurde auch ausgeführt, daß mit den klassischen Screeningmethoden immer häufiger bereits bekannte Antibiotika isoliert werden und deshalb neue Testverfahren erforderlich sind.

Ein Beispiel eines neuen Verfahrens ist der Test auf chlorhaltige Metabolite. Er wurde in einer vorangegangenen Arbeit (Krauß, 1974) entwickelt und ein Screening

mit über hundert Streptomyceten durchgeführt. Testmethode und Ergebnis des Screenings sind hier wiedergegeben. In der Fortführung wurden chlorierte Produkte von so gefundenen Stämmen isoliert und charakterisiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Mit Ausnahme der hier aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Präparate der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Niax Polyol	Brenntag, Mühlheim/Ruhr
D-Glucose Mannit	Deutsche Maizenawerke, Hamburg
Sephadex LH 20	Deutsche Pharmacia, Frankfurt
Difco Agar Hefeextrakt Malzextrakt	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Apigenin Glycin	Fluka AG, Buchs, SG, Schweiz
Asparagin Monohydrat Glutamin für biochemische Zwecke Pepton	Merck, Darmstadt
Fleischextrakt	Oxoid Deutschland, Wesel
Sojabohnenmehl	Schoenenberger, Magstadt
Amberlite XAD-2, XAD-4 300 - 1000 µm Tween 80	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Diphenyloxazol (PPO)	Zinsser Scintillators, Frankfurt

Radiochemikalien

$Na^{36}Cl$ in wäßriger Lösung	Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, GB

Die spezifische Radioaktivität der einzelnen Chargen war verschieden; sie ist jeweils bei den Ergebnissen angegeben.

^{36}Chlorbenzolstandard	New England Nuclear Corporation Boston, Mass., USA

Genistein wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Müller, Ciba-Geigy AG., Basel, Schweiz, und Herrn P.D. Dr. Zeeck, Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt.

2.2. Nährmedien

1	Komplexmedium für Streptomyceten	Sojabohnenmehl	20 g
		Mannit	20 g
		Calciumcarbonat	2 g
		Natriumchlorid	1 g
		Leitungswasser	1 l

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt.

Für Einbauversuche mit $Na^{36}Cl$ wurde das Natriumchlorid der Nährlösung weggelassen und anstelle von Leitungswasser entionisiertes Wasser verwendet (Nährlösung 1a).

2	Komplexmedium für Bacillus subtilis	Pepton	3,0 g
		Fleischextrakt	5,0 g
		Natriumchlorid	2,5 g
		Leitungswasser	1 l

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren mit Natronlauge auf 7,2 eingestellt.

3	Komplexmedium für Pilze und Streptomyceten	Hefeextrakt	4 g
		Malzextrakt	10 g
		Glucose	4 g
		Agar	20 g
		Leitungswasser	1 l

Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren mit Natronlauge auf 7,3 eingestellt.

4	Komplexmedium	Fleischextrakt	3,0 g
	für Testplatten mit	Malzextrakt	3,0 g
	Clostridium pasteurianum	Hefeextrakt	3,0 g
		Pepton	20,0 g
		Glucose	5,0 g
		Ascorbinsäure	0,2 g
		Agar	20,0 g
		entionisiertes Wasser	1 l

Der pH-Wert wurde mit Natronlauge auf 7,0 eingestellt.

5	Synthetisches Medium	KH_2PO_4	3,0 g
	für Testplatten	K_2HPO_4	7,0 g
	mit Bacillus subtilis	Natriumcitrat	0,5 g
		$MgSO_4 x 7H_2O$	0,1 g
		$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
		Glucose	2,0 g
		Agar	16,0 g
		entionisiertes Wasser	1 l

6 Synthetische Medien für Streptomyces griseus Tü 6

Durch Kombination verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie verschiedener Mineralsalzkonzentrationen wurde versucht, ein synthetisches Medium für die Chlorierung von Genistein durch Tü 6 zu finden. Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist bei den Ergebnissen (3.3.6.4.) angegeben.

C-Quellen:	20 g
Lactose, Stärke, Mannit	
Organische N-Quellen:	5 g
Glycin, Asparagin, Glutamin	

Anorganische N-Quellen: 1 g
Ammoniumsulfat, Harnstoff, Natriumnitrat

in einem Liter 0,5-, 1- oder 2-fach konzentrierter Mineralsalzlösung.

Mineralsalzlösung, doppelt konzentriert:

$MgSO_4.7H_2O$	2 g
$Ca(NO_3)_2$	2 g
$FeSO_4$	40 mg
$ZnSO_4$	10 mg

in einem Liter 1/15 m Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,4.

2.3. Organismen

2.3.1. Bakterienstämme

Eubacteriales

Bacillus subtilis Cohn ATCC 6051
Clostridium pasteurianum (Winogradsky) ATCC 6013
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers K12-W1485

Actinomycetales

Streptomyces antibioticus	Tü 8	=	ETH 7451
Streptomyces echinatus	Tü 12	=	ETH 8331
Streptomyces fradiae	Tü 27	=	ETH 13584
Streptomyces fradiae	Tü 39	=	ETH 20675
Streptomyces griseus	Tü 6	=	ETH 7419
Streptomyces hirsutus	Tü 42	=	ETH 16660
Streptomyces michiganensis	Tü 14	=	ETH 9001
Streptomyces viridochromogenes	Tü 57	=	ETH 23575

Diese Stämme sind unter der ETH-Nummer bei Hütter (1967) beschrieben.
Die übrigen sind auch nach den Kriterien von Hütter untersucht und danach folgenden Arten zugeordnet worden:

Streptomyces antibioticus Tü 26 = ETH 6451	(17.42 a)
Streptomyces antibioticus Tü 99 = ETH 31305	(17.42 a)
Streptomyces antibioticus Tü 1284	(17.42 a)
Streptomyces collinus Tü 105	(17.42 c)
Streptomyces exfoliatus Tü 1205	(17.42 b)
Streptomyces griseoflavus Tü 1218	(17.42 g-h)
Streptomyces griseoviridis Tü 1242	(17.42 f)
Streptomyces griseus Tü 40 = ETH 21035	(17.43 b)
Streptomyces rimosus Tü 58 = ETH 23801	(17.41 f)
Streptomyces rimosus Tü 441	(17.41 f)
Streptomyces tendae Tü 61 = ETH 24522	(17.42 f)
Streptomyces tendae Tü 353	(17.42 f)

In Klammern sind die Gruppennummern angegeben, die sich nach der Bestimmung mit Bergey's Manual (1974) ergeben. Die Untersuchung der C-Quellenverwertung, die dort zur endgültigen Bestimmung des Artnamens angegeben wird, wurde hier versuchsweise durchgeführt, die Ergebnisse waren jedoch unbefriedigend (Loeffler, 1977). Bei Hütter wird zur Merkmalsauswahl, auch zur C-Quellenverwertung, kritisch Stellung genommen. Da in Bergey's Manual keine neuen Gesichtspunkte dazu angegeben werden und auch die Bedingungen für die Untersuchung der C-Quellen nicht beschrieben sind, hat man sich auf die Bestimmung nach Hütter beschränkt.

Bei der Prüfung verschiedener Actinomycinproduzenten (3.2.1.) war noch ein bisher nicht bestimmter Stamm mit der Nummer Tü 1369 dabei.

2.3.2. Pilzstämme

Ascomycetes

Aspergillus nidulans (Eidam) Winter Tü 574
Aspergillus terreus Thom Tü 155
Botrytis cinerea Persoon ex Fries Tü 157
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigorakis Tü 282
Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard Tü 510

2.4. Impfmaterial von Streptomyceten

Für die Herstellung der Chloractinomycine wurden Kulturen von Tü 39 und Tü 61 mit Sporensuspensionen beimpft, deren Bereitung bei Wolf (1971) beschrieben ist.

Alle anderen Submerskulturen wurden aus Vorkulturen in gleicher Nährlösung beimpft. Alter und Menge der Vorkulturen sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.5. Kulturbedingungen für Ansätze in Kolben

500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich wurden mit 100 ml Nährlösung 1 gefüllt, sterilisiert und dann beimpft. Die Inkubation der Kolben erfolgte bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine mit 120 Upm. Veränderungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.6. Test auf lipophile chlorhaltige Metabolite

2.6.1. Anzucht der Stämme

4 ml Nährlösung 1 in Reagenzgläsern wurden aus Schrägagarröhrchen beimpft und 96 h bei 27°C in einem Gestell inkubiert, das auf der rotierenden Schüttelmaschine (120 Upm) befestigt war.
0,5 ml dieser Vorkulturen dienten als Impfmaterial für 3 ml Nährlösung 1a mit halben Sojamehlgehalt und 1 µCi $Na^{36}Cl$. Die Inkubationsbedingungen waren die gleichen wie bei den Vorkulturen.

2.6.2. Extraktion mit Äthylacetat

Da NaCl in Äthylacetat schwer löslich ist, kann Radioaktivität im Extrakt als Indiz für den Einbau von Chlor in lipophile Verbindungen dienen.

Nach 48 h Kulturdauer wurden die ganzen Kulturen mit 4 ml Äthylacetat geschüttelt. Zur sauberen Trennung der Phasen mußte dann 10 min bei 2000 g zentrifugiert werden. Die klare organische Phase wurde zur Trockne eingeengt, in 200 µl Äthylacetat aufgenommen und 100 µl davon in 10 ml Szintillationsflüssigkeit gebracht. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler (Mark I, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA). Die Szintillationsflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung: 60 g Naphthalin, 20 ml Äthylenglycol, 100 ml Methanol, 4 g PPO, Dioxan ad 1 l.
Als Leerwert dienten 3,5 ml unbeimpfter Nährlösung, die wie die Kulturen behandelt wurden.

Wenn der Test positiv ausfiel (vgl. 3.1.1.), wurde vom restlichen Extrakt ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt.

2.7. Quantitative Bestimmungen

2.7.1. Chloridbestimmung

Die Bestimmung des Chloridgehalts von Natriumchloridlösungen und Nährlösungen nach dem Sterilisieren erfolgte mercurimetrisch mit einem Merckotest-Reagentiensatz (Merck, Darmstadt).

2.7.2. Messung des Einbaus von ^{36}Chlor in extrahierbare Verbindungen

Proben von Kulturen, deren Nährlösung $Na^{36}Cl$ enthielt, wurden im Verhältnis 1:1 mit Äthylacetat extrahiert, ein Aliquot des Extrakts in Szintillationsflüssigkeit aufge-

nommen (vgl. 2.6.2.) und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler (Mark II, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA und betaszint 5001, Berthold und Frieseke Vertriebsges., Wildbad/Schwarzw.) gemessen.

2.7.3. Dünnschichtscanning

Die Verteilung der Radioaktivität auf Chromatogrammen wurde mit Hilfe eines Dünnschichtscanners (Berthold und Frieseke Vertriebsges., Wildbad/Schwarzw.) mit Autochronschreiber aufgezeichnet.

2.7.4. Photometrische Bestimmungen

Die Extinktion von Probenextrakten und Eluaten wurde mit einem Varian Techtron Spektralphotometer (Modell 635) gemessen und die Konzentrationen von Isoflavonen und Actinomycinen mit Hilfe von Eichkurven in gleichem Lösungsmittel bestimmt.

2.7.5. Plattendiffusionstest

Der Plattendiffusionstest diente zur Actinomycinbestimmung. Testorganismus war Bacillus subtilis auf Nährmedium 4. Die Herstellung der Testplatten ist bei Poralla (1967) beschrieben.

2.7.6. Verdünnungsreihentest

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen der Isoflavone für Bacillus subtilis erfolgte im Verdünnungsreihentest nach Kavanagh (1963).

2.7.7. Test auf antifungische Wirkung

Für den Test auf antifungische Wirkung wurde eine ähnliche Anordnung gewählt, wie sie für Phytoalexine beschrieben ist (Van Etten, 1973). Die Pilzstämme wurden auf Petrischalen mit 10 ml Komplexagar (Nährmedium 3) angezogen. Bewachsene Stückchen von 8 mm Durchmesser wurden ausgestanzt und auf Testplatten gelegt, die eine bestimmte Konzentration der Isoflavone in Wasseragar enthielten. Um eine Diffusion von antagonisierenden Substanzen zu vermeiden, wurden Alufoliescheibchen unter die bewachsenen Agarstückchen gelegt. Nach sechs Tagen wurden die Wachstumszonen ausgemessen.

2.7.8. Bestimmung der Isoflavonoide

Mit 50 ml Kulturfiltrat ließ sich eine verkürzte Aufarbeitung so gut reproduzierbar durchführen, daß die Methode zur Bestimmung des Isoflavonoidgehalts in Fermentern und zum Vergleich von Kulturen in Kolben geeignet ist: bei der Passage des Kulturfiltrats durch eine Amberlite XAD-2-Säule werden die Isoflavonoide gebunden, nach Waschen mit 50 ml Wasser und 30 ml Wasser/Methanol (7:3) lassen sie sich mit 20 ml Methanol eluieren.
Das Eluat wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 500 µl Methanol aufgenommen und der lösliche Anteil an Sephadex LH 20 chromatographiert. Die Absorption des

Eluats bei 254 nm wurde in einem UV-Detektor (Uvicord II, LKB, Bromma, Schweden) gemessen und durch einen Schreiber aufgezeichnet. Ein Fraktionssammler fing die Peaks getrennt auf; sie konnten durch ihre UV-Spektren und Dünnschichtchromatographie identifiziert werden. Da die Extinktionskoeffizienten von Genistein und seinen Chlorderivaten etwa gleich sind, lassen sich ihre relativen Anteile aus den Flächen der Peaks im Elutionsprofil berechnen. Die Konzentrationen können auch photometrisch bestimmt werden. Die Bestimmung der Isoflavonoide in der Nährlösung erfolgte analog.

2.8. Herstellung von ^{36}Chloractinomycinen*)

2.8.1. Anzucht von Tü 39

0,05 ml Sporensuspension von Tü 39 dienten als Impfmaterial für 50 ml Nährlösung 1a in 500 ml-Erlenmeyerkolben ohne seitlichen Einstich. Der Zusatz von $Na^{36}Cl$ erfolgte nach verschiedenen Zeiten. Das Maximum der Chloractinomycinproduktion wurde nach 96 h erreicht.

2.8.2. Anzucht von Tü 61

100 ml Nährlösung 1a wurden mit 0,1 ml Sporensuspension beimpft und sofort nach dem Beimpfen $Na^{36}Cl$ zugesetzt. Das Maximum der Chloractinomycinproduktion war nach 30 h Inkubation.

---

*) Die Herstellung von Chloractinomycinen in 10 l- bis 200 l-Fermentern wurde von Dr. H.-P. Fiedler, A. Hasenböhler, D. Neubauer und J. Sauerbier im Rahmen eines Serviceprojekts am Lehrstuhl Mikrobiologie I in Tübingen übernommen.

2.8.3. Aufarbeitung und Reinigung

Die Kulturen wurden 10 min bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand filtriert, das Sediment bei Tü 61 verworfen, bei Tü 39 dreimal mit Methanol ausgezogen. Das Kulturfiltrat wurde über eine Amberlite XAD-2-Säule gegeben, deren Bettvolumen 1/10 des Filtratvolumens betrug. Nach Waschen mit dem 10-fachen Bettvolumen an Wasser und dem 3-fachen an Wasser/Methanol (6:4) ließen sich die Chloractinomycine mit Methanol eluieren. Bei Tü 39 wurde der Sedimentauszug mit dem Eluat vereinigt. Die Eluate wurden weitgehend eingeengt und der wäßrige Rückstand dreimal mit 1/5 des Eluatvolumens an Äthylacetat extrahiert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol und an Kieselgel 60 (Merck, Korngröße 0,05 - 0,2 mm) in einem Elutionsmittel aus Petroläther 40°C - 60°C, Benzol, Chloroform und Methanol (60:10:30:5). Die Menge des Säulenmaterials betrug das 100-fache der aufgetragenen Substanz.

2.9. Herstellung von Chlorisoflavonen

2.9.1. Anzucht von Tü 6 im Kolben

100 ml Nährlösung 1 wurden mit 3 ml einer 24 h alten Vorkultur von Tü 6 beimpft und wie in 2.5. beschrieben inkubiert.

2.9.2. Anzucht von Tü 6 im 10 l-Fermenter

1 l einer 24 h alten Vorkultur diente als Impfmaterial für 10 l-Fermenter (Modell MF 14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) mit 9 l Nährlösung 1.

Bei 220 Upm wurden 3 l Luft/min zugeführt; die Inkubationstemperatur war 27°C. Durch Zusatz von 1 ml Polyol ließ sich die Schaumbildung unterdrücken. Die Aufarbeitung erfolgte nach 40 bis 44 h.

2.9.3. Aufarbeitung und Reinigung

Kulturen aus Kolben wurden 10 min bei 2000 g zentrifugiert, bei Fermentern ließ sich das Mycel im Westfalia Separator (Westfalia Separator AG, Oelde/Westf.) abtrennen; es kann verworfen werden. Die Kulturflüssigkeit wurde durch Faltenfilter filtriert und über Amberlite XAD-2 gegeben (Bettvolumen 1/10 des Filtratvolumens). Nach Waschen mit dem 10-fachen Bettvolumen an Wasser und je dem 3-fachen an Wasser/Methanol im Verhältnis 9:1, 7:3 und 1:1 konnten die Isoflavone mit Methanol eluiert werden. Das Methanol wurde aus dem Eluat am Vakuum entfernt und der wäßrige Rückstand dreimal mit 1/5 des Eluatvolumens an Äthylacetat extrahiert. Der methanollösliche Anteil des eingeengten Extrakts ließ sich an Sephadex LH 20 in Methanol auftrennen. Die Gelmenge betrug das 100-fache der aufgetragenen Substanz.

2.9.4. Herstellung ^{36}Chlor-markierter Isoflavone

Die Herstellung der markierten Chlorisoflavone erfolgte in Nährlösung 1a mit $Na^{36}Cl$-Zusatz analog zu den nicht markierten in 500 ml-Erlenmeyerkolben.

2.10. Isolierung der Isoflavone aus Sojamehl

2 g Sojamehl, die Menge, die in 100 ml Nährlösung 1 enthalten ist, wurde mit 50 ml Methanol 30 min bei 40°C gerührt, dann abfiltriert und das Filtrat, das die Glycoside enthielt, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Nach Aufnahme des Rückstands in 25 ml 6%-iger Salzsäure erfolgte die Hydrolyse der Isoflavonglycoside innerhalb von 45 min im kochenden Wasserbad. Aus dem abgekühlten Hydrolysat ließen sich die Isoflavone mit Äther extrahieren. Der Äther wurde entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und die Isoflavone an Sephadex LH 20 getrennt.

2.11. Chlorierung von Genistein in synthetischem Medium

Mit neun verschiedenen Kombinationen von Nährlösung 6 sollte ein synthetisches Medium gesucht werden, in dem Genistein von Tü 6 chloriert wird. 5 ml von vier Tage alten Vorkulturen in jeweils der gleichen Nährlösung dienten als Impfmaterial. Pro 100 ml Nährlösung wurden 8 mg Genistein und 2 µCi $Na^{36}Cl$ zugesetzt und während zehn Tagen täglich die Radioaktivität von Probenextrakten gemessen (vgl. 2.7.2.). Der Nachweis von Chlorgenistein erfolgte autoradiographisch in Chromatogrammen von Extrakten.

2.12. Methoden zur chemischen und physikalischen Charakterisierung

2.12.1. Dünnschichtchromatographie

Zur Identifizierung und halbquantitativen Bestimmung verschiedener Substanzen dienten Dünnschichtchromatogramme

auf Kieselgel-Alufolien (Kieselgel 60/Kieselgur, Schichtdicke 0,2 mm, F 254) der Firma Merck, Darmstadt. Für präparative Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Alufolien ohne Fluoreszenzindikator (Merck) verwendet, gleiche Substanzmengen strichförmig aufgetragen, die Banden nach dem Entwickeln ausgekratzt und die Radioaktivität gemessen oder die Extinktion im Methanoleluat gemessen.

Fließmittel:
1) Chloroform, Methanol (92:8)
2) Petroläther, Chloroform, Benzol, Methanol (60:30:10:5)

Sprühreagentien:
1) 3 g $FeCl_3$ in 100 ml 0,5 n HCl
2) H_2SO_4 konz./Methanol (1:1)

2.12.2. Autoradiographie

Die Lokalisierung radioaktiver Substanzen auf Chromatogrammen erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilmen (Osray T 4) der Firma Agfa Gevaert. Nach mindestens viertägiger Exposition wurden sie entwickelt.

2.12.3. UV-Spektren

Die Identifizierung von Actinomycinen und Isoflavonen erfolgte unter anderem aufgrund der UV-Spektren, die mit einem Varian Techtron Spektralphotometer (Modell 635) aufgenommen wurden. Lösungsmittel war Methanol (Uvasol, Merck). Die Spektren der Isoflavone wurden wie bei Mabry et al. (1970) beschrieben auch nach Zusatz von

1) 6 Tropfen einer Lösung von 5 g wasserfreiem Aluminiumchlorid in 100 ml Methanol
2) 3 Tropfen einer Lösung von 2,5 g Natrium in 100 ml Methanol

registriert.

2.12.4. IR-Spektren

IR-Spektren wurden in KBr mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Modell 137) aufgenommen.

2.12.5. Massenspektren*)

Die Massenspektren der Genisteinderivate ließen sich an einem Massenspektrometer Varian MAT CH 7 durch Direkteinlaß bei 70 eV aufnehmen. Die exakten Massenbestimmungen erfolgten an einem Varian MAT SM 1B nach dem Peak-Match-Verfahren bei einer Auflösung von 10.000.

2.12.6. ^{1}H-NMR-Spektren*)

^{1}H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker WH 270-Gerät (270 MHz) registriert. Als Lösungsmittel diente $CDCl_3$ unter Zusatz von wenig Aceton-d_6; als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet.

*) NMR- und Massenspektren wurden bei Professor Dr. W.A. König, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Hamburg, aufgenommen.

2.13. Biologische Charakterisierung durch Bioautographie

Zum Auffinden von antibiotisch wirksamen Substanzen auf Dünnschichtchromatogrammen ist die Bioautographie geeignet. Die Methode ist bei Kirst (1971) beschrieben. Die Herstellung der Testplatten erfolgte für Botrytis cinerea nach Hütter et al. (1965), für Escherichia coli nach Fickenscher (1970), für Bacillus subtilis nach Poralla (1967) und für Clostridium pasteurianum nach Santo (1976).

3. E R G E B N I S S E

3.1. Extrahierbare chlorhaltige Metabolite aus Streptomyceten

3.1.1. Screening

129 Streptomycetenstämme wurden mit dem in 2.6. beschriebenen Test auf Chloreinbau in lipophile Verbindungen geprüft. Sie waren alle schon im üblichen Screening auf Antibiotikabildung getestet worden. Sieben Produzenten bekannter chlorhaltiger Antibiotika waren darunter, um die Brauchbarkeit des Tests zu prüfen. Extrakte aus den Kulturen, die in $Na^{36}Cl$-haltiger Nährlösung gewachsen waren, wurden positiv bewertet, wenn mindestens 50 dpm darin gemessen wurden. Diese Grenze liegt so hoch, daß background-Streuungen darunter liegen sollten; andererseits lassen sich Substanzen mit dieser Radioaktivität im Chromatrogramm schon autoradiographisch lokalisieren. Der Leerwert mit unbeimpfter Nährlösung lag bei 10 dpm.

11 Stämme wurden so gefunden, die bisher nicht als Produzenten chlorhaltiger Substanzen bekannt waren und dazu fünf von den sieben bekannten. Die beiden, die auf diese Weise nicht gefunden wurden, der Produzent von Lysolipin und der von Arenaemycin, hätten andere Kultur- bzw. Aufarbeitungsbedingungen erfordert (Lemke, 1971; Drautz, 1975).

In Tabelle 1 sind die Stämme zusammengestellt, die mindestens in einem Testansatz und einem größeren Ansatz im Kolben positiv waren. Wenn Antibiotika von ihnen bekannt sind, sind diese angegeben; die ersten fünf bilden die angeführten chlorhaltigen Antibiotika. Die beiden letzten Spalten zeigen die Radioaktivität der Extrakte aus den Testansätzen. Der Test wurde im Reagenzglas durchgeführt. Dadurch ist der Aufwand minimal, die Kulturbedingungen jedoch schwer reproduzierbar, da Vorkultur und Nährlösung Suspensionen sind, die sich in den kleinen Mengen nicht

genau dosieren lassen. Außerdem ist die Belüftung nicht sehr gut. Daraus dürften sich die teilweise großen Unterschiede zwischen den beiden Testansätzen erklären.

Tabelle 1: Streptomyceten, die Chlorid aus der Nährlösung in lipophile Verbindungen einbauen, - Antibiotika, die sie bilden, - Radioaktivität der Extrakte im Test

Stamm	Nr.	Antibiotikum	Ergebnis von 2 Testansätzen (dpm) 1.	2.
S.aureofaciens	Tü 24	Chlortetracyclin	190	<50
S.viridochromogenes	Tü 57	Avilamycin	14470	9870
S.antibioticus	Tü 99	Chlorothricin	150	180
S.collinus	Tü 105	Naphthomycin		100
S.tendae	Tü 353	Naphthomycin	3270	<50
S.griseus	Tü 6	Albomycin	2010	2100
S.antibioticus	Tü 8	Rhodomycin	1920	500
S.echinatus	Tü 12	Echinomycin	390	580
S.fradiae	Tü 39	Actinomycin Z	480	50
S.hirsutus	Tü 42			80
S.rimosus	Tü 58	Oxytetracyclin	120	<50
S.rimosus	Tü 441	Oxytetracyclin		70
S.exfoliatus	Tü 1205		510	190
S.griseoflavus	Tü 1218		270	120
S.griseoviridis	Tü 1242		350	3800
S.antibioticus	Tü 1284		2470	650

Die beiden Stämme von Streptomyces rimosus wurden nicht weiter bearbeitet, weil sie vermutlich Chlortetracyclin oder Derivate davon bilden. Die chlorierten Produkte der Stämme

Tü 8 und Tü 1284 von Streptomyces antibioticus erwiesen sich beim dünnschichtchromatographischen Vergleich in mehreren Fließmitteln als identisch. Für weitere Versuche wurde nur noch Tü 8 verwendet.

3.1.2. Die Produktion der chlorhaltigen Substanzen

Die einheitlichen Kultur- und Aufarbeitungsbedingungen konnten nicht für alle Substanzen optimal sein, deshalb wurde der Einbau von ^{36}Chlor in extrahierbare Verbindungen vier Tage lang verfolgt. Sofort nach dem Beimpfen mit 3 ml von vier Tage alten Vorkulturen wurden den Ansätzen 4,7 µCi $Na^{36}Cl$, entsprechend 0,5 mg Cl, zugesetzt.

Die Probenbehandlung ist in 2.7.2. beschrieben. Die Ermittlung des Fehlers ergab eine Standardabweichung, die fünf bis fünfzehn Prozent vom Mittelwert ausmacht, aber meist unter zehn Prozent liegt. Erwartungsgemäß ist der Chloreinbau bei einem Überschuß an Chlorid und gleichem Gesamtchloridgehalt proportional zum Anteil an $Na^{36}Cl$ in der Nährlösung. Die korrigierte Gerade (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) geht durch Null. Danach lassen sich also die äußeren Bedingungen - Kultur und Probenbehandlung - so reproduzierbar durchführen, daß ein Vergleich verschiedener Ansätze möglich ist.

In Abbildung 1a und 1b sind Chloreinbau und pH-Verlauf bei den Stämmen aus dem Screening dargestellt. Die Bildung der chlorhaltigen Substanzen erfolgt zu verschiedenen Kulturzeiten und in ganz verschiedenem Ausmaß; in Abbildung 1b mußte der Maßstab auf das vierfache gestreckt werden, damit der Chloreinbau noch dargestellt werden konnte.

Die Radioaktivität der Extrakte ist nur ein Maß für die Gesamtmenge an chlorhaltigen Verbindungen. Die Anzahl der markierten, also chlorhaltigen Substanzen wurde den Autoradiogrammen der chromatographierten Extrakte entnommen. Die Radioaktivität ist nicht gleichmäßig auf die Substanzen verteilt; es lassen sich Hauptkomponenten angeben, die bei Tü 6 und Tü 39 über 80 % des Chlors enthalten.

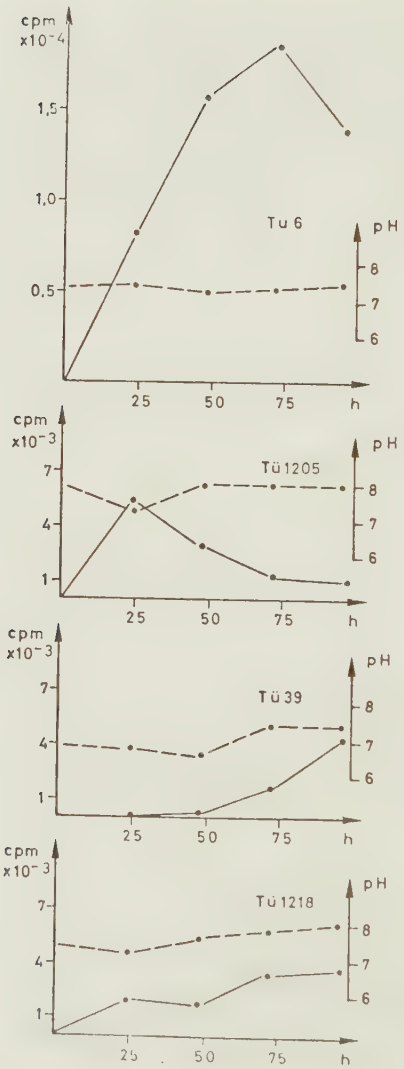


Abbildung 1a: Chloreinbau und pH-Verlauf in ^{36}chlormarkierten Kulturen
Radioaktivität/500 µl Probenextrakt: ———
pH der Kulturen: ------

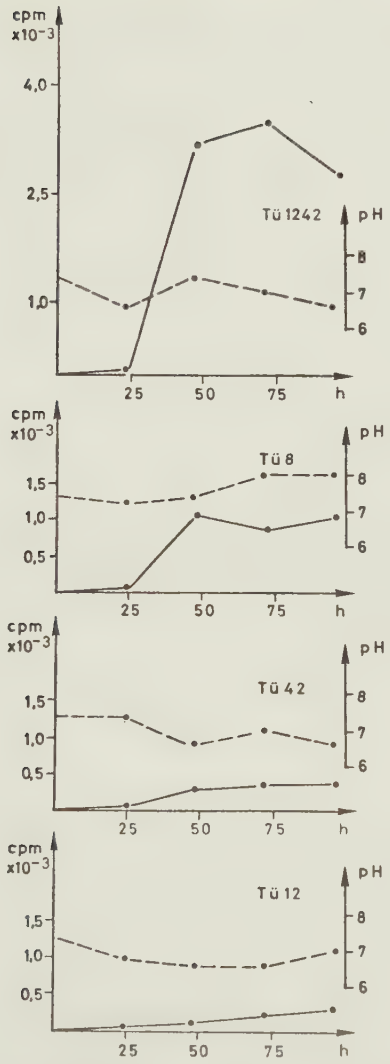


Abbildung 1b: Chloreinbau und pH-Verlauf in ^{36}chlormarkierten Kulturen
Radioaktivität/500 µl Probenextrakt: ———
pH der Kulturen: ------

In Tabelle 2 ist die Anzahl der Hauptkomponenten und der maximal unterscheidbaren Banden dem maximalen Chlorgehalt gegenübergestellt, der sich aus der Radioaktivität der Extrakte errechnen läßt. Die Verdünnung durch den Chloridgehalt der Nährlösung wurde dabei nicht berücksichtigt; er ist so niedrig, daß mit der in 2.7.1. angegebenen Methode nur ein Höchstwert bestimmt werden konnte. Danach enthält ein Liter Nährlösung nicht mehr als 2 mg Chlorid. Der tatsächliche Chlorgehalt liegt also maximal um 2/5 höher als in der Tabelle angegeben.

Tabelle 2: Chlorgehalt der Extrakte - Hauptkomponenten und Gesamtzahl der chlorhaltigen Substanzen

Stamm Nr.	Chlorgehalt der Extrakte (µg/ml)	Hauptkomponenten	Gesamtzahl der Chlorverbindungen
Tü 6	1,6	4	12
Tü 39	0,4	1	6
Tü 1205	0,5	2	5
Tü 1242	0,3	1	10
Tü 1218	0,3	3	7
Tü 8	0,1	1	8
Tü 42	0,03	1	1
Tü 12	0,03	4	8

Die Werte in Tabelle 2 zeigen die Empfindlichkeit der Nachweismethode: Substanzen, die nur wenige Nanogramm an Chlor enthalten, sind im Autoradiogramm sichtbar. Es lassen sich daraus auch die zu erwartenden molaren Ausbeuten von den Hauptkomponenten abschätzen. Nach der Reihenfolge dieser Ausbeuten sind die Stämme in der Tabelle geordnet.

3.1.3. Kriterien für die Auswahl der weiter bearbeiteten Stämme

Unter den 57 Substanzen bzw. den 17 Hauptkomponenten mußte eine Auswahl getroffen werden, weil sie nicht alle gleichzeitig bearbeitet werden konnten.

Kriterien waren:

1) Die nach Tabelle 2 zu erwartenden Ausbeuten. Sie liegen nach dem Chlorgehalt ungefähr zwischen 1 µMol/l für die Substanzen aus Tü 12 und 10 µMol/l für die aus Tü 6. Bei einem Molekulargewicht von 1000 wären das 1 - 10 mg/l.

2) Die Identifizierung mit anderen Eigenschaften als der Radioaktivität. Damit die Substanzen in größerem Maßstab fermentiert werden konnten, mußten sie ohne radioaktive Markierung zu bestimmen sein. Um geeignete Eigenschaften zu finden, wurden konzentrierte Extrakte chromatographiert, die chlorhaltigen Banden autoradiographisch lokalisiert und Farbe, Fluoreszenz, Fluoreszenzlöschung und die Reaktion mit verschiedenen Sprühreagentien geprüft. Zur biologischen Charakterisierung dienten Bioautogramme mit Escherichia coli, Bacillus subtilis, Clostridium pasteurianum und Botrytis cinerea.

Bei den beiden Stämmen, die die höchsten Ausbeuten erwarten ließen, konnten den Hauptkomponenten auf diese Weise charakteristische Eigenschaften zugeordnet werden, die sich auch im Verlauf der weiteren Reinigung nicht von den Chlorverbindungen trennen ließen. In Tabelle 3 sind sie zusammengestellt.

Die Banden im Chromatogramm wurden vom Start aus durchnumeriert; die Komponenten sind in der Tabelle durch die Nummern gekennzeichnet.

Tabelle 3: Erste Charakterisierung der chlorhaltigen Hauptkomponenten aus Tü 6 und Tü 39

Stamm Nr.	Tü 6				Tü 39
Bande Nr.	6	7	8	9	6
Farbe	-	-	-	-	gelb
Fluoreszenz bei 350 nm	blau-grün	blau	dunkelviolett		rot
Fluoreszenz-löschung bei 254 nm	-	-	+	+	+
$FeCl_3$-Reaktion	-	-	violett	violett	-
Färbung mit H_2SO_4	-	-	rosa	rosa	rot
Hemmhöfe im Bioautogramm (mm)					
Bacillus subt.	-	-	12	15	25
Clostridium past.	-	-	Spur	15	13
Escherichia coli	-	-	-	-	-
Hemmung von					
Botrytis cinerea	-	-	+	+	+

Bei keinem der anderen Stämme war eine so einfache Charakterisierung möglich. Tü 6 und Tü 39 wurden deshalb bevorzugt weiter bearbeitet. Ihre Produkte sind in 3.2. und 3.3. beschrieben.

3.2. Chloractinomycine

Aus Tü 39 ist Actinomycin Z isoliert worden (Bossi et al., 1958). Wegen der Farbe und antibiotischen Aktivität bestand deshalb der Verdacht, daß es sich hier um ein chlorhaltiges Actinomycin handelt. In einer angeschlossenen Arbeit (Bergmann, 1975) wurde das bestätigt.

Die Aminosäureanalyse des Chloractinomycinhydrolysats zeigte die für die Z-Gruppe typischen Aminosäuren: N-Methylalanin, 5-Methylprolin, 4-Oxo-5-methylprolin sowie Sarkosin, Valin, N-Methylvalin und Threonin. Der Bindungsort des Chlors konnte bisher nicht ermittelt werden, weil es bei der sauren Hydrolyse des Actinomycins, eventuell als HCl, abgespalten wird.

Natürliche chlorhaltige Actinomycine waren vorher nicht beschrieben. Bossi et al. hatten ebenfalls eine Nährlösung aus Sojamehl und Mannit verwendet, aber ohne Zusatz von NaCl. Der Chloridgehalt der Nährlösung war dann so niedrig, daß sie das chlorierte Actinomycin nur als Nebenkomponente hätten erhalten können. Da neue Actinomycinvarianten immer noch interessant sind (vgl. 4.3.), sollte das Chloractinomycin in größeren Mengen hergestellt werden. Außerdem wurden die sechs weiteren Actinomycinproduzenten der Tübinger Stammsammlung auf chlorhaltige Komponenten untersucht.

3.2.1. Prüfung verschiedener Actinomycinproduzenten auf Chloreinbau

Kulturen von Tü 39 und den sechs anderen Actinomycinproduzenten wurden mit 3 ml vier Tage alter Vorkulturen beimpft und je 2,5 µCi $Na^{36}Cl$, entsprechend 0,23 mg Cl, zugefügt. Tabelle 4 zeigt die maximale Radioaktivität der Probenextrakte und die Kulturzeit, nach der sie erreicht wurde. Ferner ist vermerkt, daß bei drei Stämmen unter diesen Bedingungen keine Actinomycinbildung nachweisbar war.

Tabelle 4: Actinomycinbildung und Chloreinbau

Stamm Nr.	Actinomycin-bildung	dpm/500 µl Probenextrakt	Inkubationszeit (Tage)
Tü 39	+	2970	5
Tü 61	+	14190	2
Tü 27	+	-	5
Tü 1369	+	80	5
Tü 40	-	130	5
Tü 26	-	-	
Tü 14	-	-	

Durch Autoradiographie der Chromatogramme ließ sich zeigen, daß ^{36}Chlor bei Tü 61 ebenfalls in ein Actinomycin eingebaut war. Die geringe Radioaktivität der Extrakte von Tü 40 und Tü 1369 findet sich in Banden vom gleichen Rf-Wert wie das Chloractinomycin aus Tü 61. An den entsprechenden Stellen im Chromatogramm war jedoch kein Actinomycin nachweisbar. Folgende Überlegung soll zeigen, daß es sich dennoch auch hier um Chloractinomycine handeln könnte, die von den Stämmen in ganz geringen Mengen gebildet werden: Die Radioaktivität der Extrakte mit 80 und 130 dpm entspricht 10^{-5} mg Cl/ml. Unter Berücksichtigung des Chloridgehalts der Nährlösung von etwa 2 mg/l enthielt der Extrakt $2 \cdot 10^{-5}$ mg Cl/ml. Actinomycine haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 1000. Wenn die $2 \cdot 10^{-5}$ mg Chlor in Actinomycin eingebaut sind, ergibt das eine Actinomycinkonzentration von 0,6 µg/ml. In dieser Konzentration lassen sich die Chloractinomycine aber weder photometrisch noch biologisch bestimmen.

Bei Tü 1369 ist ein chlorfreies Actinomycin von größerem Rf-Wert nachweisbar; der Stamm produziert vermutlich Actinomycin D (Dähn, 1975).

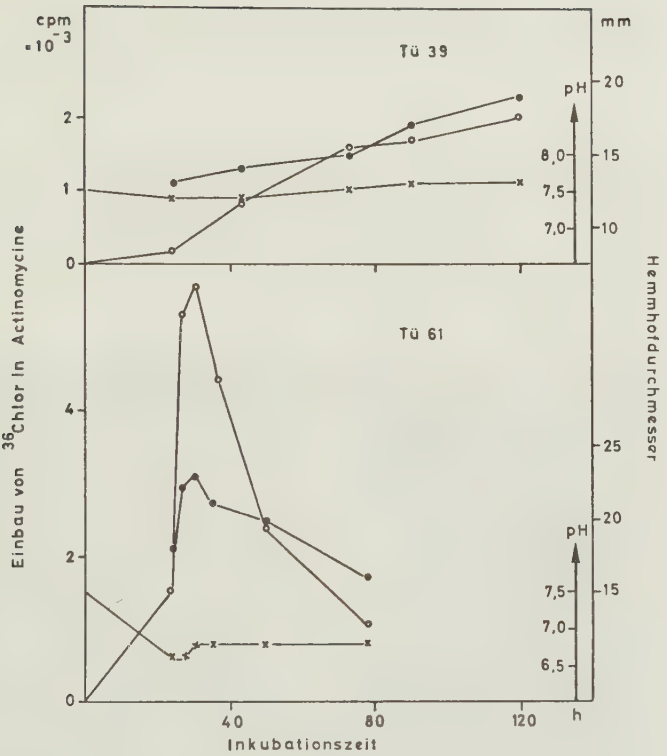


Abbildung 2: Produktion der Chloractinomycine aus Tü 39 und Tü 61

o——o : Radioaktivität der Probenextrakte (500 µl)

●——● : Hemmhöfe auf Bacillus subtilis

x——x : pH der Kulturen

3.2.2. Vergleich der Chloractinomycine aus Tü 39 und Tü 61

3.2.2.1. Produktion

Abbildung 2 zeigt den Kulturverlauf der beiden Stämme. Die Anzucht erfolgte nach 2.7.2.; 100 ml Kultur enthielten 1 µCi $Na^{36}Cl$, entsprechend 0,09 mg Cl. Normalerweise wird das Produktionsmaximum der Actinomycine wie bei Tü 39 nach 4 bis 6 Tagen erreicht, in der stationären Wachstumsphase (Woodruff und Waksman, 1968). Es liegt also bei Tü 61 ungewöhnlich früh. Der Stamm wächst auch schneller als Tü 39, aber die Chloractinomycinkonzentration in der Kultur nimmt schon vor dem Erreichen der stationären Phase wieder ab (Fiedler, 1977).

3.2.2.2. Charakterisierung

Streptomyceten bilden im allgemeinen mehrere Actinomycine gleichzeitig (Katz, 1968), die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden. Wie Abbildung 3 zeigt, lassen sich im Dünnschichtchromatogramm bei Tü 39 zwei Hauptkomponenten unterscheiden, von denen die lipophilere Chlor enthält. Tü 61 zeigt nur eine, chlorhaltige Hauptkomponente. Die hydrophileren Nebenkomponenten werden schon an Amberlite XAD-2 abgetrennt. Die Hauptkomponenten wurden für die Charakterisierung durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. Von den chromatographisch einheitlichen Substanzen lassen sich aber durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie noch Nebenkomponenten abtrennen.*)

---

*) Diese Untersuchungen wurden von Professor Dr. W. Keller-Schierlein, ETH Zürich, durchgeführt.

Radioaktiv markierte Präparate der beiden Chloractinomycine wurden verglichen. In Tabelle 5 sind ihre Eigenschaften zusammengestellt.

Das Chloractinomycin aus Tü 39 enthält ein Atom Chlor pro Molekül Actinomycin.*) Da die gleichartig markierten Präparate gleich radioaktiv sind, hat das Chloractinomycin aus Tü 61 denselben Chlorgehalt.

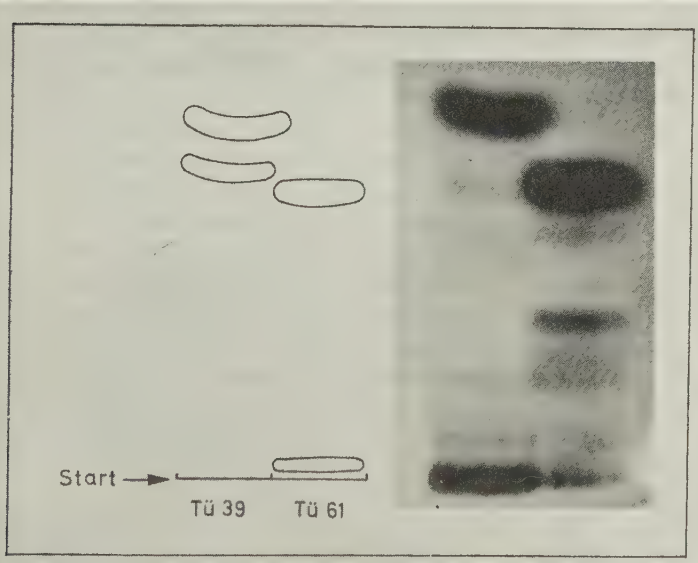


Abbildung 3: Chromatogramm (links) und Autoradiogramm (rechts) von Extrakten aus Tü 39 und Tü 61 in Fließmittel 2
Gelbe Banden (Actinomycine) wurden eingezeichnet.

*) Diese Untersuchungen wurden von Professor Dr. W. Keller-Schierlein, ETH Zürich, durchgeführt.

Tabelle 5: Vergleich der Chloractinomycine aus Tü 39 und Tü 61

Produzent	Extinktion bei 443 nm	cpm	Hemmhof-durchmesser	Rf-Wert
Tü 39	0,3	6750	19	0,32
Tü 61	0,3	6950	22	0,25

Das Chloractinomycin aus Tü 39 ist etwas lipophiler und weniger wirksam gegen Bacillus subtilis als das aus Tü 61. Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Chloractinomycinkonzentration.

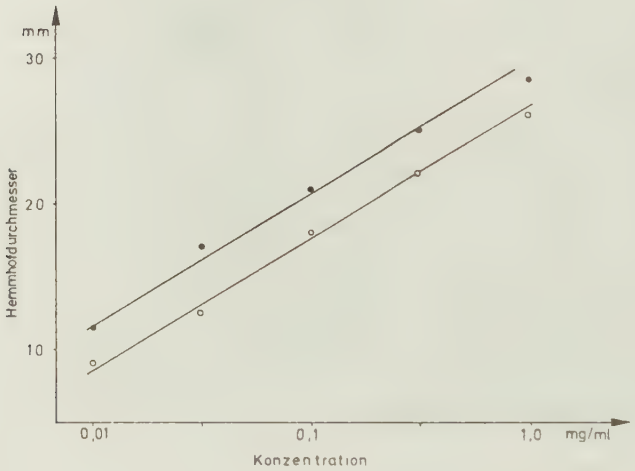


Abbildung 4: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Chloractinomycinkonzentration

●——● : Tü 61
○——○ : Tü 39

3.2.3. Optimierung der Chloractinomycinproduktion bei Tü 39

Während Tü 61 reproduzierbare Ergebnisse lieferte, waren die Kulturen von Tü 39 sehr verschieden, selbst wenn sie aus Klonen beimpft wurden. Empfindlichkeit gegen pH-Änderungen und starke Belüftung sowie die Abhängigkeit vom Alter des Impfmaterials wurden auch bei anderen Actinomycinproduzenten beobachtet (Woodruff und Waksman, 1968). Folgende Veränderungen gegenüber den ursprünglichen Bedingungen führten zu reproduzierbarem Kulturverlauf mit den doppelten Ausbeuten an Chloractinomycin:

1. Verwendung frischer Sporensuspensionen anstelle von Vorkulturen.
2. Kolben ohne seitliche Einstiche; der Unterschied der Produktion geht aus Abbildung 5 hervor. Entsprechend wirkte sich bei größeren Fermentationen die Umstellung von einem Umwurfsystem zu Blattrührern vorteilhaft aus. Es zeigen sich auch Unterschiede in der Mycelkonsistenz: Die Ausbildung von Mycelpellets ist korreliert mit guter Produktion, in Kolben mit seitlichen Einstichen ist das Mycel meist schleimig.
3. Geringere Füllmenge; von Kolben mit 50, 100 und 150 ml Nährlösung erwiesen sich die mit 50 ml als am besten.

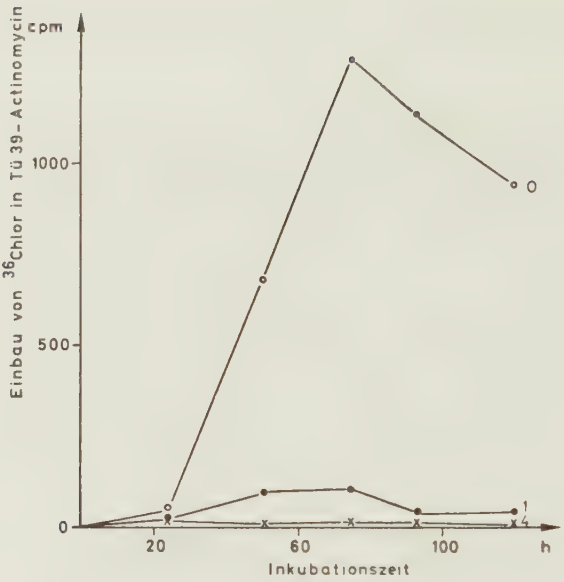


Abbildung 5: Produktion von Tü 39-Chloractinomycin in verschiedenen Kolben, gemessen am Einbau von ^{36}Chlor in 100 µl Extrakt

0 : Kolben ohne Einstich
1 : Kolben mit einem seitlichen Einstich
4 : Kolben mit vier seitlichen Einstichen

3.3. Chlorisoflavone

Für Tü 6 ist die Bildung von Albomycin beschrieben (Zähner et al., 1960). Es war klar, daß die chlorhaltigen Substanzen nicht damit verwandt sind, denn Albomycin ist hydrophil und wirkt im Gegensatz zu den chlorhaltigen Substanzen gegen Escherichia coli.

Wie aus den folgenden Ergebnissen hervorgeht, erwiesen sich die chlorhaltigen Hauptkomponenten aus Tü 6 (Bande 6, 7, 8 und 9 aus Tabelle 3) als Isoflavone. Der Einfachheit halber werden sie von Anfang an so bezeichnet.

3.3.1. Herstellung der Chlorisoflavone

Die Fermentation ist unter 2.9.2. beschrieben. Die optimalen Bedingungen ergaben sich aus Versuchen, deren Resultate in 3.5. und 3.6. dargestellt sind.

Die Aufarbeitung der Fermenter - Abpressen durch Filterschichten und Extraktion mit Äthylacetat - war mit großen Verlusten verbunden, so daß eine Optimierung erforderlich wurde.

3.3.1.1. Optimierung der Aufarbeitung

Das Gemisch ^{36}chlormarkierter Isoflavone, wie es im Extrakt vorliegt, wurde unmarkiertem Kulturfiltrat zugefügt und damit verschiedene Aufarbeitungsschritte in kleinem Maßstab durchgeführt. Tabelle 6 zeigt die Ausbeute in Prozent der eingesetzten Radioaktivität nach der angegebenen Behandlung.

Tabelle 6: Ausbeute an Chlorisoflavonen bei verschiedener Behandlung des Kulturfiltrats

Methode	Ausbeute
Passage durch Filterschichten	22 %
Nachwaschen mit Wasser	70 %
	92 %
Extraktion mit Äthylacetat dreimal mit 1/3 Volumen	87 %
Amberlite XAD-2	100 %
Amberlite XAD-4	100 %

Wegen der Absorption der Isoflavone an die Filterschichten wurden die Kulturen künftig nicht mehr abgepreßt, sondern das Mycel am Westfalia Separator entfernt. Die Extraktion ist zwar effektiv, im großen Maßstab aber wegen der Bildung äußerst stabiler Emulsionen ungeeignet; deshalb wurde die Bindung an Amberlite XAD-2 vorgezogen und erst das Eluat extrahiert.

3.3.1.2. Aufarbeitung und Reinigung

Tabelle 7 zeigt die Aufarbeitung und Ausbeute einer 10 l-Fermentation und die Bilanz aus der Aufarbeitung von 30 ml wie in 3.3.1.1. markiertem Kulturfiltrat.

Tabelle 7: Aufarbeitung und Reinigung

10 l-Fermenter		Behandlung	30 ml Kulturfiltrat	dpm	Ausbeute	Anreicherung
10	l	Kultur				
		↓ Abtrennen des Mycels				
8	l	Filtrat	780 mg	$1,0 \cdot 10^6$	100%	1
		↓ Amberlite XAD-2				
1,8	g	Eluat	19 mg	$1,1 \cdot 10^6$	100%	44
		↓ Extraktion mit Äthylacetat				
0,8	g	Extrakt	8 mg	$5,5 \cdot 10^5$	55%	53
		↓ Sephadex LH 20				
148	mg	getrennte Isoflavone	<1 mg	$4,9 \cdot 10^5$	49%	>370

Im einzelnen wurden aus dem 10 l-Fermenter isoliert:
46 mg Monochlorgenistein (Bande 8 aus Tabelle 3)
17 mg Dichlorgenistein (Bande 9 aus Tabelle 3)
23 mg Gemisch aus Mono- und Dichlorgenistein
62 mg Fluoreszierende Substanzen (Bande 6 und 7 aus Tabelle 3).

Unter ungünstigen Bedingungen (3.3.6.) erhält man die chlorfreien Isoflavone.

Der Verlust beim Extraktionsschritt ist auf die Bildung eines schwerlöslichen Niederschlags beim Einengen des XAD-Eluats zurückzuführen. Bei markiertem Kulturfiltrat kann er über 40 % der Radioaktivität enthalten.

Hydroxylierte Isoflavone bilden Metallkomplexe. Da Metallspuren in Lösungsmitteln und Sorbentien immer vorhanden sind, ist die Aufarbeitung mit Verlusten verbunden. Chromatographie an Aluminiumoxid ist deshalb ganz ungeeignet und auch Kieselgel erwies sich als ungünstig.

In Abbildung 6 sind das LH-20-Elutionsprofil der markierten Verbindungen und die Scanneraufzeichnungen von den chromatographierten Peaks dargestellt. Der erste Peak enthält die fluoreszierenden Substanzen 6 und 7. Das UV-Spektrum dieser Fraktion gleicht dem von Daidzein (Mabry et al., 1970).

Die beiden chlorierten Genisteine, Peak 8 und Peak 9, sind chromatographisch einheitlich. Trotz der geringen Unterschiede im Rf-Wert sind die vier Substanzen getrennt nebeneinander sichtbar.

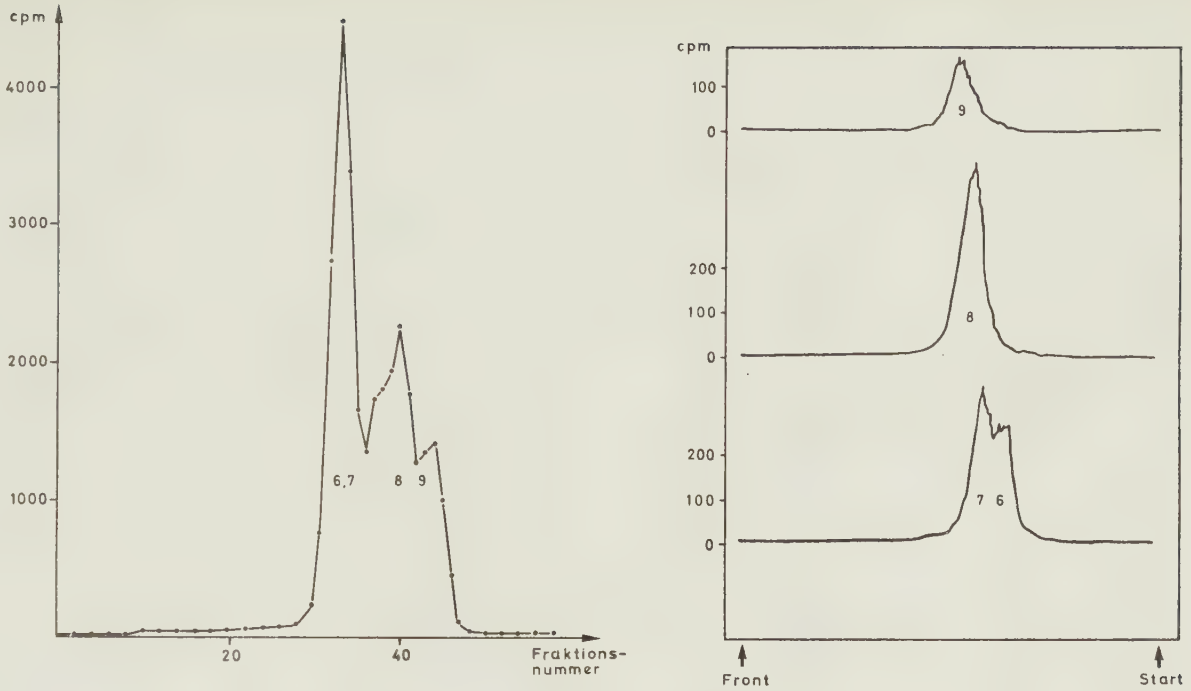


Abbildung 6: Elutionsprofil der Chlorisoflavone von LH 20 (links)
Scannerprofile der chromatographierten Peaks (rechts)

Die Nummern entsprechen denen aus Tabelle 3

3.3.2. Charakterisierung und Strukturaufklärung

3.3.2.1. Farbreaktion mit $FeCl_3$

Die Violettfärbung mit $FeCl_3$ (vgl. Tabelle 3) wies auf Substanzen mit phenolischem Charakter hin.

3.3.2.2. UV-Spektren

Die UV-Spektren der beiden chlorierten Genisteine gleichen dem des Genisteins (Abbildung 7). Bei Zusatz von Natriummethylat erfährt das Maximum eine bathochrome Verschiebung. Mit Aluminiumchlorid findet man bei allen drei Verbindungen Maxima bei 273, 312 und 366 nm, die sich auch nach Zusatz von HCl nicht ändern.

3.3.2.3. IR-Spektren

Die IR-Spektren des Genisteins und seiner chlorierten Derivate zeigen breite Hydroxylbanden sowie Absorptionen von C=C-Valenzschwingungen bei 1600 cm^{-1}, eine Carbonylabsorption bei 1650 cm^{-1} und die C-O-Valenzschwingung bei 1250 cm^{-1} (Abbildung 8).

Abbildung 7: UV-Spektrum der Genisteine

In Methanol: ———
Nach Zusatz von
Natriummethylat: ------

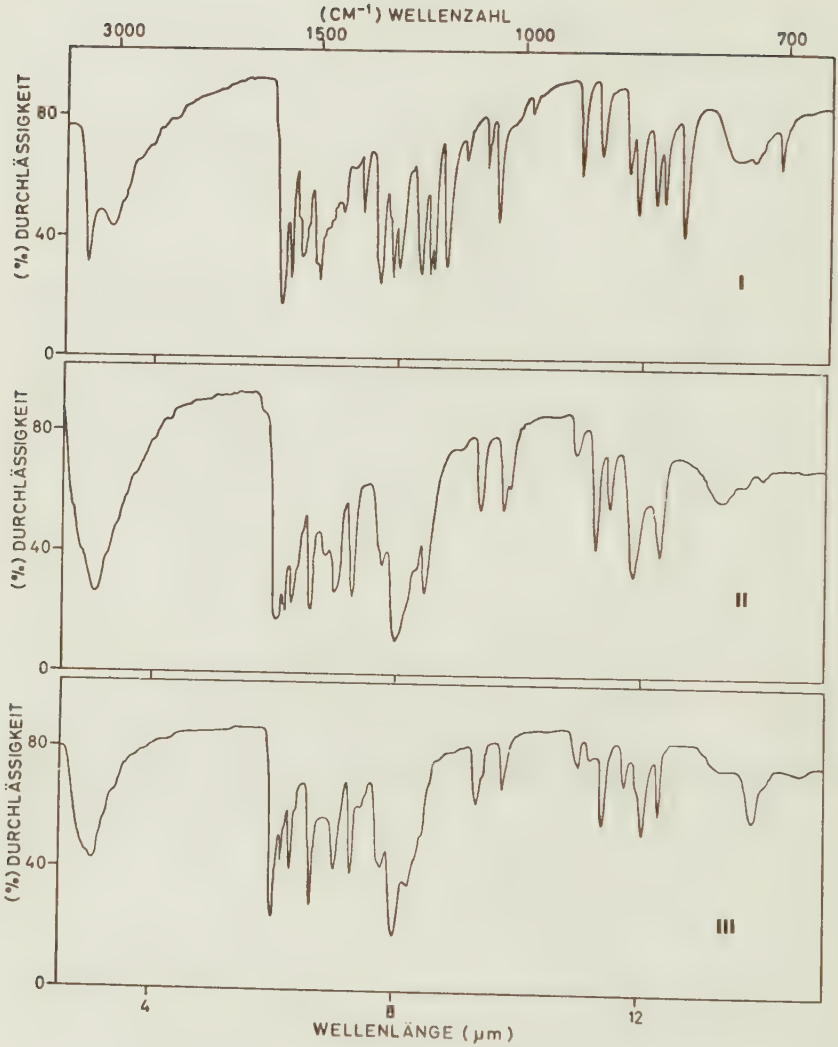


Abbildung 8: IR-Spektren von Genistein (I)
6-Chlorgenistein (II)
6,3'(5')-Dichlorgenistein (III)

3.3.2.4. Massenspektrometrische Untersuchungen*)

Das Massenspektrum der chlorfreien Substanz weist einen Molekülpeak (100 % rel. Int.) bei m/e 270 auf (Abbildung 9a). Eine exakte Massenbestimmung mittels Hochauflösungsmassenspektrometrie ergab die Summenformel $C_{15}H_{10}O_5$. Die Anzahl der Hydroxylgruppen wurde durch Trifluoracetylierung bzw. Trimethylsilylierung bestimmt. Die Massenspektren beider Derivate lassen erkennen, daß drei OH-Gruppen substituiert werden. Das Molekulargewicht des Trifluoracetylderivates beträgt 558, das des Trimethylsilylderivates 486. Die Molekül-Ionen in den Massenspektren können eindeutig zugeordnet werden.

Diese Daten und die Untersuchung der massenspektrometrischen Fragmentierung wiesen auf ein Flavonderivat hin. Das zunächst vermutete Apigenin erwies sich beim Vergleich als nicht identisch, dagegen glich das UV-Spektrum dem des isomeren Genisteins. Die Massenspektren von Apigenin und Genistein und deren Trimethylsilylderivate unterscheiden sich nur geringfügig; charakteristische Unterschiede weisen außer den UV-Spektren auch die NMR-Spektren auf.

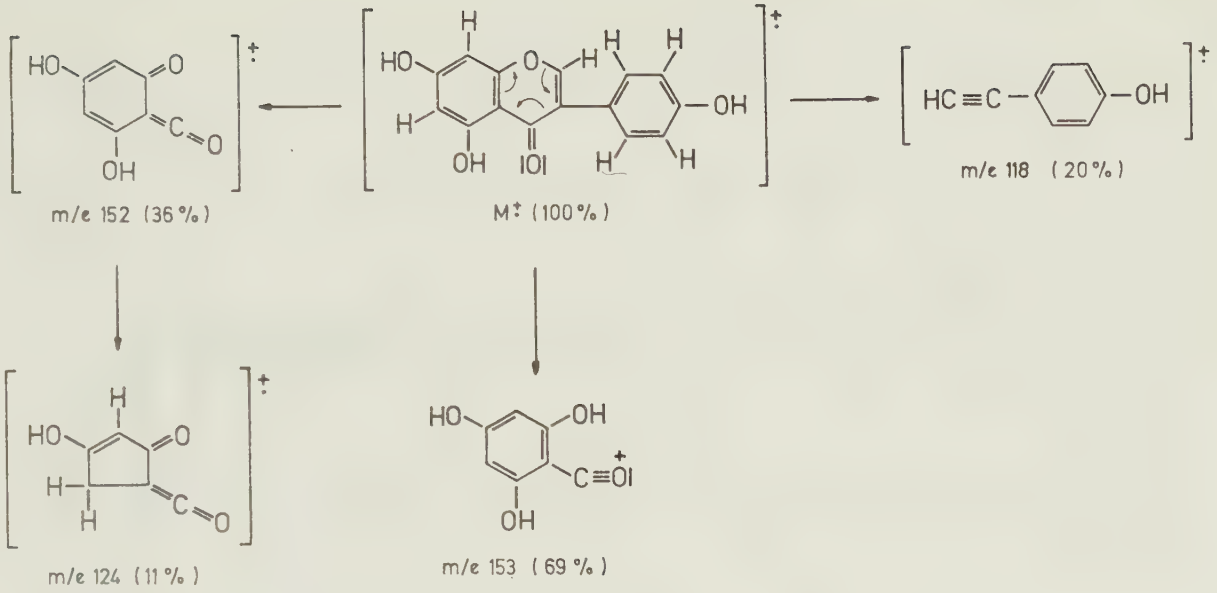
Für die Identifizierung der Position der Cl-Substituenten in den chlorierten Substanzen aus Tü 6 war die massenspektrometrische Fragmentierung von großer Bedeutung. Die Massenspektren von Flavonen und Isoflavonen sind von Audier (1966) untersucht worden. Im Schema 1 sind die charakteristischen Fragmentionen und die zugehörigen relativen Intensitäten des Massenspektrums von Genistein wiedergegeben.

---

*) Untersuchungen und Interpretation von Professor Dr. W.A. König, Universität Hamburg.

Die Molekülionen im Massenspektrum bei m/e 304 und 306 bzw. 338 und 340 der chlorierten Substanzen lassen das Isotopenverhältnis einer Mono- bzw. Dichlorverbindung erkennen. Die Massenverschiebung von 270 (Genistein) nach 304 weist auf die Substitution eines H-Atoms durch Chlor hin. Dies wird durch Hochauflösungsmassenspektrometrie (Summenformel $C_{15}H_9O_5Cl$) bestätigt. Die Tatsache, daß das Fragmention der Massenzahl 118 bei der Monochlorverbindung nicht nach höherer Masse verschoben ist, deutet an, daß der Chlorsubstituent im Benzopyronsystem zu suchen ist. Das Fehlen eines intensiven Ions bei m/e 152 und m/e 153 und das Auftreten der um 34 Masseneinheiten nach m/e 186 und m/e 187 verschobenen Ionen lassen den Schluß zu, daß die Substitution in Stellung 6 oder 8 des Genisteins erfolgt ist. Dieser Befund wird durch eine Massenverschiebung von m/e 124 im Genistein nach m/e 158 im Monochlorderivat gestützt und durch Hochauflösungsmessungen des Ions bei m/e 186 ($C_7H_3O_4Cl$) bewiesen.

Auch bei der Dichlorverbindung lassen Massenverschiebungen im unteren Massenbereich Hinweise auf die Position der Chlorsubstituenten zu. Die Fragmentionen des Genisteinspektrums bei m/e 118, m/e 152 und m/e 153 liegen hier jeweils um 34 Masseneinheiten höher bei m/e 152 (C_8H_5OCl), m/e 186 ($C_7H_3O_4Cl$) und m/e 187 ($C_7H_4O_4Cl$). Daraus folgt, daß sich sowohl in 6- oder 8-Stellung des Genisteins als auch an dem p-Hydroxyphenylrest ein Chlorsubstituent befindet.



Schema 1: Massenspektrometrische Fragmentierung von Genistein

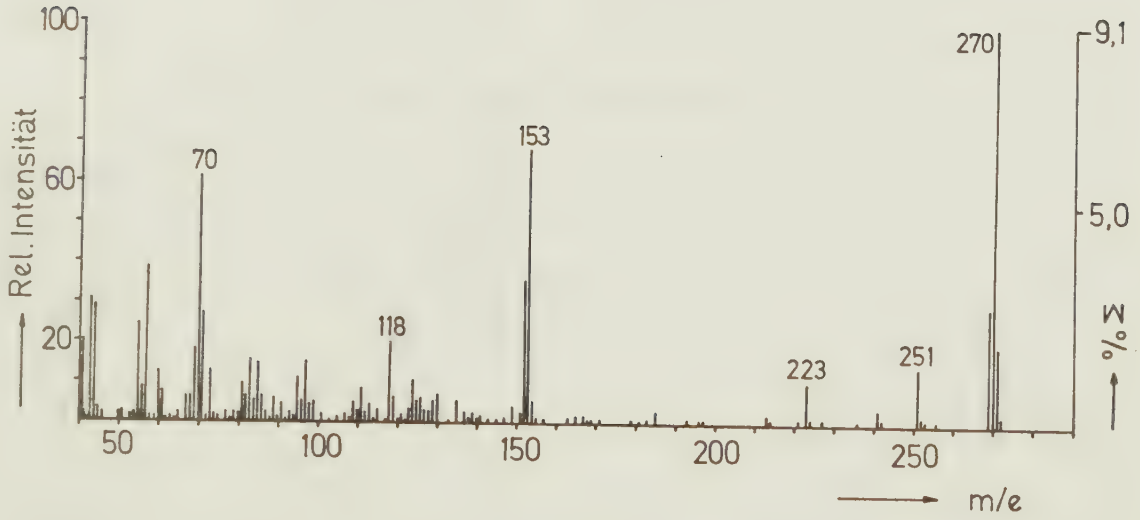


Abbildung 9a: Massenspektrum von Genistein

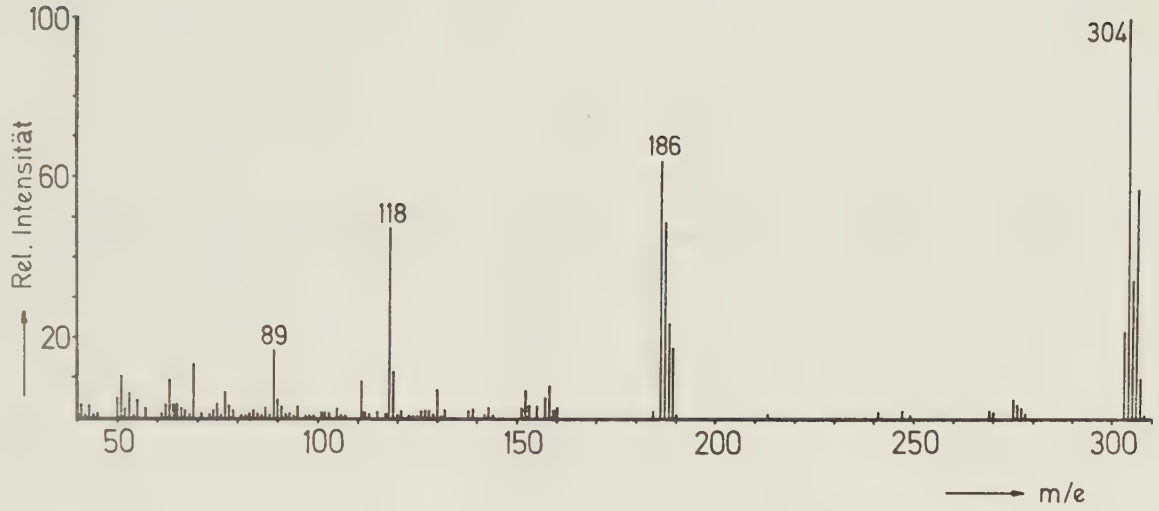


Abbildung 9b: Massenspektrum von 6- Chlorgenistein

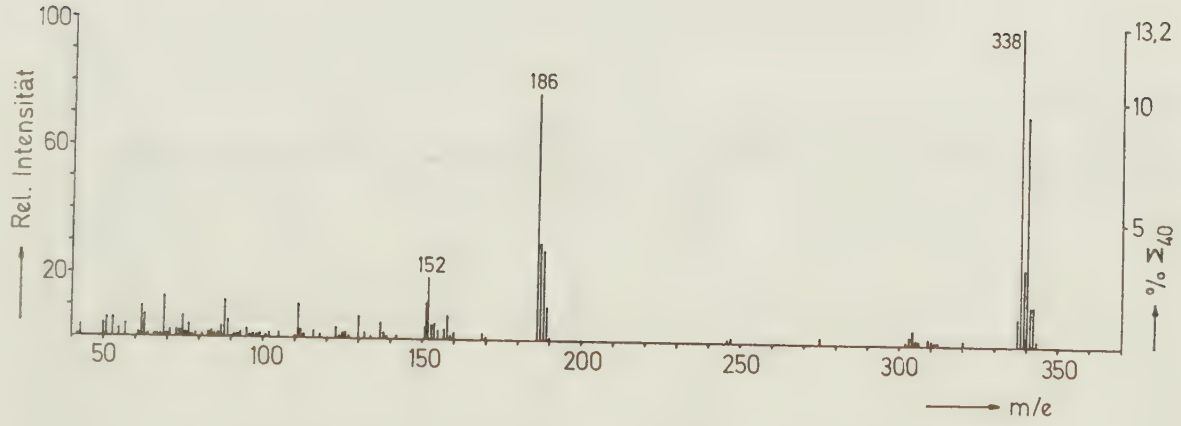


Abbildung 9c: Massenspektrum von 6,3'(5')-Dichlorgenistein

3.3.2.5. NMR-Untersuchungen*)

Die Protonenresonanzspektren der drei Isoflavone wurden mit den Spektren von Flavon- und Isoflavonderivaten aus der Literatur (Mabry et al., 1970) verglichen. Die Zuordnung der einzelnen Protonensignale wird dort angegeben. Vergleicht man das Spektrum des Monochlorderivats (Abbildung 10B) mit dem von Genistein (Abbildung 10A), so erkennt man, daß das Signal des Protons in Position 6 (δ = 6,3 ppm) fehlt, während das durch Metakopplung zwischen H-6 und H-8 (J = 2,2 Hz) bei Genistein als Dublett erscheinende Signal des H-8 (δ = 6,42 ppm) in Monochlorgenistein als Singulett (δ = 6,5 ppm) erscheint. Der Rest des Spektrums bleibt, abgesehen von geringen Abweichungen der chemischen Verschiebungen, unverändert. Insbesondere die durch Orthokupplung als Dubletts (J = 8,6 Hz) erscheinenden Signale der H-3'- und H-5'-Protonen (δ = 6,93 ppm) bzw. der H-2'- und H-6'-Protonen (δ = 7,48 ppm) sind in beiden Spektren identisch. Da sich die Einführung eines Chlorsubstituenten in ein aromatisches System auf die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen nur wenig auswirkt, kann angenommen werden, daß das fehlende Signal des H-6-Protons auf eine Chlorsubstitution in Stellung 6 zurückzuführen ist.

Eine tiefgreifende Veränderung des NMR-Spektrums ist bei dem Dichlorderivat zu beobachten (Abbildung 10C). Das Signal des H-6-Protons fehlt auch hier, was für eine Chlorsubstitution in Position 6 spricht. Zusätzlich erkennt man, daß im p-Hydroxyphenylsubstituenten des Isoflavons nur noch drei Protonenresonanzen auftreten. Zwei orthoständige Protonen erscheinen als Dublett (J = 8,6 Hz; δ = 7,1 ppm) bzw. als Dublett eines Dubletts (J_1 = 8,6 Hz, J_2 = 2,2 Hz; δ = 7,46 ppm). Hierbei kann es sich nur um die H-2'- und H-3'-Protonen (bzw. H-5'- und H-6'-Protonen)

---

*) Vgl. Seite 47

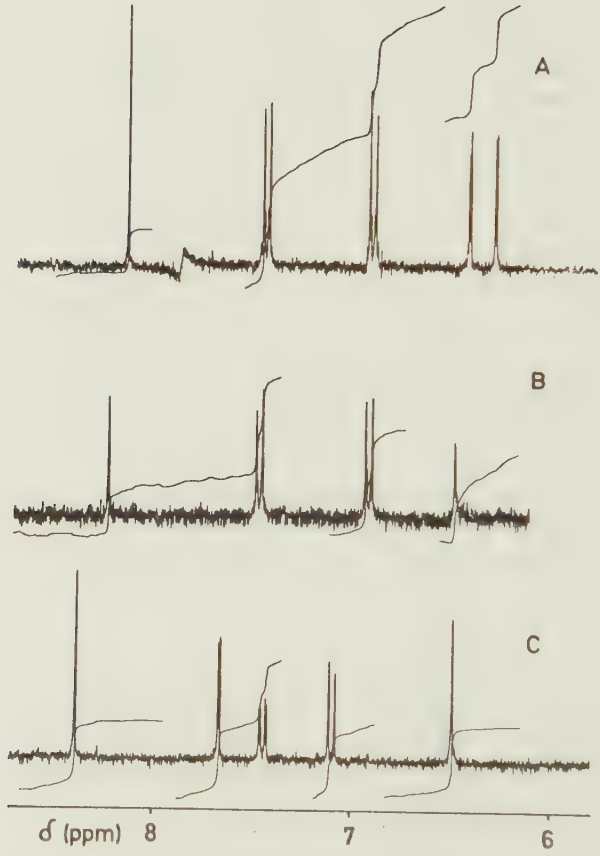


Abbildung 10: NMR-Spektren von Genistein (A)
6-Chlorgenistein (B)
6,3'(5')-Dichlorgenistein (C)

handeln. Ein weiteres Resonanzsignal bei δ = 7,68 ppm tritt als Dublett auf (J = 2,2 Hz). Die Kopplungskonstante spricht für eine Metakopplung, während der Wert der chemischen Verschiebung erkennen läßt, daß dieses Signal einem Proton in Stellung 2' (bzw. 6') zuzuordnen ist. Bei der Dichlorverbindung muß es sich daher um 6,3'(5')-Dichlorgenistein handeln.

3.3.3. Antibiotische Eigenschaften

Unter den Stämmen aus dem Screening war Tü 6 nicht nur wegen der besten Verwertung des angebotenen Chlorids, sondern auch wegen der antibiotischen Aktivität der Chlorgenisteine aufgefallen (vgl. 3.1.3.). Mit den gereinigten Produkten wurden die minimalen Hemmkonzentrationen für Bacillus subtilis bestimmt; es ergaben sich folgende Werte:

MHK für Bacillus subtilis (µg/ml)	
Genistein	>250
6-Chlorgenistein	150
6,3'(5')-Dichlorgenistein	100

Es ist zwar ein deutlicher Unterschied zwischen Genistein und den chlorierten Derivaten, doch liegen die Konzentrationen sehr hoch, verglichen mit den Werten für Antibiotika. Die Wirkung der Chlorgenisteine gegen Botrytis cinerea wurde erwähnt (3.1.3.). Zudem ist eine antifungische Wirkung von Genistein beschrieben (Ingham, 1976) und ein chlorhaltiges Flavon, Chlorflavonin, ist sehr wirksam gegen eine Anzahl von Pilzstämmen (Richards et al., 1969). Deshalb wurde die antifungische Wirkung der Chlorgenisteine untersucht. Im Plattendiffusionstest zeigten Lösungen von 1 mg/ml keine nennenswerte Hemmung der geprüften Pilzstämme. Mit einer veränderten Testanordnung (2.7.7.)

ließ sich ein Effekt zeigen (Tabelle 8). Die Ausbreitung des Mycels von Botrytis, Microsporum und Trichophyton ist auf Agar, der 100 µg der Chlorgenisteine pro ml enthält, vollständig unterdrückt. Der Effekt von Genistein ist wesentlich geringer. Die minimale Hemmkonzentration des Chlorgenisteingemischs lag für die geprüften Pilzstämme über 10 µg/ml.

Tabelle 8: Antifungische Wirkung von Genistein und seinen chlorhaltigen Derivaten

Testorganismus	Durchmesser der Wachstumszonen (mm) Kontrolle	Genistein	Chlorgenisteine (Gemisch)
Aspergillus nidulans	30	30	25
Aspergillus terreus	40	30	30
Botrytis cinerea	35	20	-
Mikrosporum gypseum	30	20	-
Trichophyton mentagrophytes	25	20	-

3.3.4. Herkunft der Isoflavone

Isoflavone sind charakteristische Stoffwechselprodukte von Leguminosen; eine gesicherte de novo Synthese von Flavonoidstrukturen bei Bakterien ist nicht bekannt (Swain, 1975). Daher lag die Vermutung nahe, daß Tü 6 Substanzen aus dem Sojamehl der Nährlösung umwandelt. Die Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein wurden in Form ihrer Glucoside aus Sojamehl isoliert (Naim et al., 1973), die Aglycone konnten in der Nährlösung 1 nicht nachgewiesen werden, sie ließen sich jedoch aus dem sauren Hydrolysat der entsprechenden Menge Sojamehl (2.9.) leicht extrahieren und identifizieren.

Da die Glycoside wie die Aglycone an Amberlite XAD-2 binden und an Sephadex LH 20 getrennt werden können, läßt sich im Elutionsprofil die Umsetzung durch Tü 6 zeigen (Abbildung 11).

3.3.5. Hydrolyse der Isoflavonglycoside durch Tü 6

Die Hydrolyse beginnt 10 bis 20 h nach dem Beimpfen der Nährlösung mit Tü 6; sie erfolgt nicht in unbeimpftem Medium. Der Zeitpunkt des Beginns hängt vom Alter der Vorkulturen ab: er liegt am frühesten bei 24 h bis 30 h alten Vorkulturen. Als erstes Aglycon ist Genistein im Probenextrakt nachweisbar, die beiden fluoreszierenden Banden 6 und 7 (Tabelle 3), vermutlich Daidzein und Glycitein, findet man erst einige Stunden später.

3.3.6. Chlorierung der Isoflavone durch Tü 6

3.3.6.1. Einfluß der Chloridkonzentration

Ohne NaCl-Zusatz reicht die Chloridkonzentration der Nährlösung 1 nicht zur vollständigen Chlorierung der Isoflavone aus; man isoliert vorwiegend die chlorfreien Verbindungen. Da Genistein und seine chlorierten Derivate an Sephadex LH 20 getrennt werden und ihre UV-Absorption sich nicht unterscheidet, kann man aus den Peakflächen der Elutionsprofile die relativen Anteile der einzelnen Komponenten ermitteln. In Tabelle 9 sind sie für verschiedene Chloridkonzentrationen angegeben. Aus je zwei 40 h alten Kulturen und je drei Bestimmungen wurde der Mittelwert errechnet. Nur für die niedrigen Werte von Dichlorgenistein liegt die Standardabweichung vom Mittelwert über 10 %, bei den meisten Werten ist sie kleiner als 5 %.

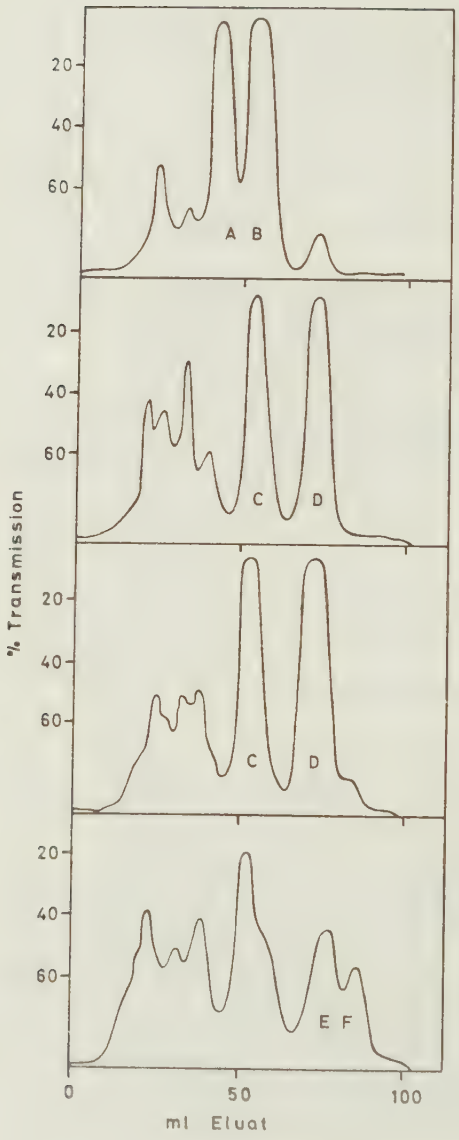


Abbildung 11: Elution der Isoflavone von Sephadex LH 20

Tabelle 9: Anteile von Genistein und seinen chlorhaltigen Derivaten bei verschiedenem Chloridgehalt der Nährlösung

NaCl-Zusatz zu 100 ml Nährlösung (mg)		0	0,1	1	10	100	1000
Gesamtgenisteine		100	100	100	100	100	-
Genistein	(%)	61					-
6-Chlorgenistein		38	92	70	67	67	-
6,3'(5')-Dichlorgenistein		3	8	30	34	33	-

Es ist nicht auszuschließen, daß 6-Chlorgenistein noch kleine Anteile an chlorfreiem Genistein enthält; diese beiden Komponenten trennen sich nur, wenn sie in etwa gleichen Mengen vorliegen.

Bei einem Zusatz von 1 g NaCl ist keine der Komponenten mehr nachzuweisen. Stattdessen tritt eine Substanz mit kleinerem Rf-Wert im Chromatogramm auf und das LH 20-Elutionsprofil ist völlig verändert.

3.3.6.2. Einfluß der Belüftung auf die Chlorierung

Bei schlechter Belüftung der Kulturen erfolgt zwar die Hydrolyse der Isoflavonglycoside, aber die Chlorierung unterbleibt fast ganz. Sie erfolgt nur in Kolben, die durch seitliche Einstiche bei Inkubation auf der rotierenden Schüttelmaschine eine bessere Belüftung gewähren. In Abbildung 11 sieht man den Effekt auf das LH 20-Elutionsprofil, und in Abbildung 12 ist der ^{36} Chloreinbau bei den verschiedenen Kolbenformen dargestellt.

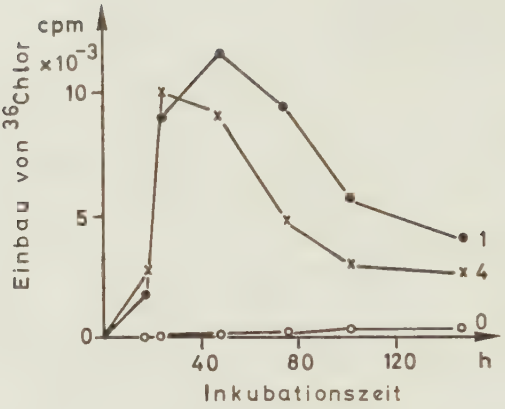


Abbildung 12: ^{36}Chloreinbau bei verschiedener Belüftung

0 : Kolben ohne Einstich
1 : Kolben mit einem seitlichen Einstich
4 : Kolben mit vier seitlichen Einstichen

3.3.6.3. Zeitpunkt der Chlorierung

Wenn Chlorid von Anfang an in der Nährlösung enthalten ist, wird nach 50 h ein Maximum an extrahierbaren chlorierten Substanzen erreicht, nach 72 h ist nur noch die Hälfte vorhanden. Setzt man jedoch das Chlorid erst nach 50 h zu, so wird innerhalb von 24 h nahezu der gleiche Einbau erreicht wie bei Markierung von Anfang an (Abbildung 13). Die Isoflavone lassen sich also auch nachträglich, unabhängig von der Hydrolyse, chlorieren. Außerdem scheint die Chlorierung die weitere Umsetzung der Verbindungen zu beeinflussen.

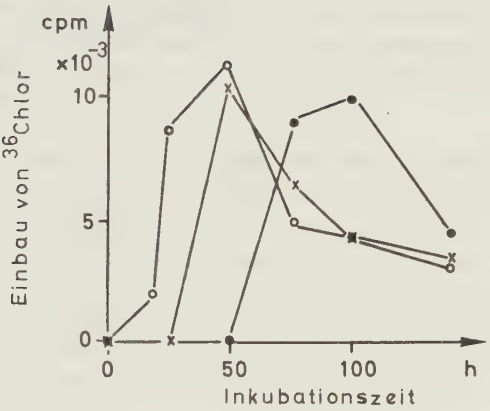


Abbildung 13: Chloreinbau bei $Na^{36}Cl$-Zusatz nach verschiedenen Zeiten

o——o : Zugabe sofort nach Beimpfen
x——x : Zugabe nach 24 h
●——● : Zugabe nach 50 h

3.3.6.4. Chlorierung von Genistein in synthetischen Nährmedien

In Nährlösung 1 hat man immer ein Gemisch von Isoflavonen vorliegen. Untersuchungen zum Chlorierungsmechanismus und die Ermittlung der Substratspezifität sind aber nur in Nährmedien exakt durchführbar, die selbst kein Substrat enthalten. Deshalb wurde in neun verschiedenen synthetischen Medien der Einbau von ^{36}Chlor in Genistein geprüft. In Tabelle 11 sind die neun Kombinationen von Nährlösung 6 (2.2.) angegeben. 100 ml enthielten 8 mg Genistein und 2 µCi $Na^{36}Cl$, entsprechend

0,14 mg Cl. Ein Überschuß an Substrat gegenüber Chlorid entspricht den Verhältnissen bei den Einbauversuchen in Komplexmedium.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Nährmedien

Nährlösung 6	a	b	c	d	e	f	g	h	i
Lactose	+			+			+		
Stärke			+			+			+
Mannit		+			+			+	
Glycin				+	+	+			
Asparagin	+	+	+						
Glutamin							+	+	+
Ammoniumsulfat	+					+		+	
Harnstoff		+		+					+
Natriumnitrat			+		+		+		
Konzentration 0,5	+				+				+
der 1,0			+	+				+	
Mineralsalze 2,0		+				+	+		

Tü 6 wuchs in allen Nährlösungen. In Nährlösung 6e und 6h erfolgte keine Chlorierung, in den übrigen nahm der Chloreinbau über 10 Tage dauernd zu. In Tabelle 12 ist der Einbau nach 10 Tagen in Prozent des eingesetzten ^{36}Chlor zusammengestellt.

Tabelle 12: ^{36}Chloreinbau in Genistein in verschiedenen synthetischen Medien

Nährlösung 6	a	b	c	d	e	f	g	h	i
^{36}Chloreinbau, Prozent vom Angebot	3,5	1,0	2,1	2,9	0	0,7	0,8	0	1,0

Von den untersuchten Nährlösungsbestandteilen erwies sich Lactose als günstigste C-Quelle, Asparagin und Harnstoff als geeignete N-Quellen und eine niedrige Mineralsalzkonzentration als am besten.

Autoradiogramme zeigten, daß das Chlor in Genistein eingebaut war; Mono- und Dichlorgenistein waren nachweisbar.

Die Chlorierung erfolgt im synthetischen Medium langsamer und nur zu zehn Prozent im Vergleich zum Komplexmedium, die Voraussetzung für weitere Versuche ist damit aber gegeben.

3.3.7. Umsetzung der Isoflavone in Nährlösung 1 durch andere chlorierende Streptomyceten

Die bakterielle Umsetzung von Isoflavonen wurde nach Angaben von Barz und Hösel (1975) fast nur bei Organismen aus der Intestinalflora untersucht; es ist nicht auszuschließen, daß es Streptomyceten gibt, die Isoflavone vollständig metabolisieren können.

Die hydrolysierten Sojamehlbestandteile treten außer bei Tü 6 noch bei fünf weiteren Stämmen aus dem Screening auf. Keiner dieser Stämme chloriert sie jedoch in dem Ausmaß wie Tü 6. Wenn die Kulturen wie Tü 6 aufgearbeitet werden, findet man bei Tü 39 und Tü 1218 chlorierte Nebenkomponenten mit dem gleichen Rf-Wert wie Chlorgenistein. Die Konzentrationen reichten jedoch für eine eindeutige Identifzierung nicht aus.

4. DISKUSSION

4.1. Eignung des Tests für ein Screening auf Antibiotika

Wie aus 3.1.1. hervorgeht, wurden mit dem Test auf lipophile chlorhaltige Metabolite Substanzen erfaßt, die nur in wenigen µg/l Kultur gebildet werden. Damit ist klar, daß die Isolierung und Charakterisierung dieser Verbindungen schwierig sein wird, insbesondere, weil sie meist neben mehreren anderen lipophilen Produkten vorkommen, die in viel größeren Mengen anfallen. Wenn die Begleitsubstanzen auch noch antibiotisch aktiv sind, wird es nahezu unmöglich, ohne großen Aufwand zu entscheiden, ob die chlorhaltigen Substanzen ebenfalls wirksam und ihre weitere Bearbeitung lohnend ist. Man könnte natürlich die Ausschlußgrenze höher ziehen, dann sind aber Antibiotika auch wieder an ihrer Wirkung selbst zu erkennen und das Ergebnis eines solchen Screenings dürfte einem Ausschnitt aus dem klassischen Antibiotikascreening entsprechen, d.h., man würde die bekannten chlorhaltigen Antibiotika finden.

Man wird aus dem Dilemma nicht ganz herauskommen: Antibiotika, die in großen Mengen gebildet werden, dürften zum großen Teil bekannt sein und man muß in Zukunft wohl auf jeden Fall einen größeren Aufwand zur Entdeckung von Wirkstoffen in Kauf nehmen, sei es bei der Isolierung, sei es bei der Testmethode. Denn nicht alles, was die üblichen Testkeime nicht hemmt, ist von vornherein uninteressant. So sind mehrere Arbeitsgruppen dazu übergegangen, andere Kriterien miteinzubeziehen wie z.B. die cytostatische Wirkung (Hanka et al., 1975; Arai et al., 1976) oder die Hemmung bestimmter Enzyme, die pharmakologische Bedeutung haben könnte (Aoyagi et al., 1975; Chimura et al., 1975; Kurylowicz et al., 1976). Eine Übersicht über Einsatzmöglichkeiten und neue Testmethoden für Antibiotika gibt Zähner (1976).

Der Test auf chlorhaltige Metabolite ist einfach und empfindlich. Nach den in der Einleitung genannten pharmakologischen Effekten von Chlorverbindungen, dürfte sich der erforderliche größere Aufwand bei der Isolierung lohnen. Man sollte dann aber nicht nur die antibiotische Wirkung in Betracht ziehen.

4.2. Die isolierten Substanzen

Chloractinomycine und Chlorisoflavonoide waren Sonderfälle hinsichtlich ihrer auffälligen Eigenschaften wie Farbe und Fluoreszenz. Da zudem unter Testbedingungen, also in chloridarmen Medien, neben den chlorhaltigen auch die chlorfreien Verbindungen gebildet wurden, die sich anfangs nicht unterscheiden ließen, waren sie besonders leicht erkennbar und damit ohne radioaktive Markierung zu fermentieren. Weil sie außerdem noch versprachen, biologisch aktiv zu sein, ist es nicht verwunderlich, daß sie zuerst bearbeitet wurden.

Die Grundstruktur der Actinomycine und der Isoflavone ist nun keineswegs neu und die Chlorisoflavone sind nach den Ergebnissen der biologischen Charakterisierung zu wenig wirksam (3.3.3.), um als Antibiotika Bedeutung zu haben. Dennoch besteht vorerst an beiden Verbindungen Interesse, wie in den folgenden Abschnitten dargelegt werden soll.

4.2.1. Chloractinomycine

Actinomycine sind zur Behandlung bestimmter Neoplasmen geeignet (Farber und Mitus, 1968; Karnofsky, 1968). Wegen ihrer hohen Toxizität ist ihr Einsatz in der Medizin je-

doch beschränkt (Schwartz et al., 1968). Die bekannten Actinomycine unterscheiden sich in der Toxizität (Hackmann, 1968) und bis heute hofft man, Varianten mit besseren Eigenschaften zu finden. Deshalb werden immer noch Neuentdeckungen publiziert (Wagman et al., 1976). Vor allem wurden aber durch gesteuerte Biosynthese und durch chemische Veränderungen neue Actinomycine hergestellt und untersucht (Meienhofer und Atherton, 1973; Hollstein, 1974; Moore et al., 1975; Mason und Katz, 1975).

Abbildung 14 zeigt die Grundstruktur der Actinomycine.

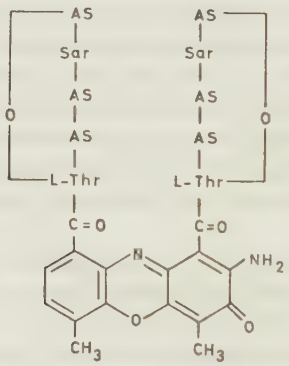


Abbildung 14: Actinomycin
AS: variable Aminosäuren
Sar: Sarkosin

Die biosynthetischen Actinomycine unterscheiden sich nur in der Zusammensetzung der Aminosäuren. Chemische Veränderungen wurden sowohl am Peptidteil als auch am Chromophor vorgenommen. Auch Halogensubstitution an Position 2 und 7 sind gelungen (Brockmann et al., 1966).

Substitution an C-2 bewirkt Inaktivierung, Substitution an C-7 führt zu Derivaten, die hoch aktiv gegen Bacillus subtilis sind; die Wirksamkeit gegen Tumoren wird nicht angegeben. Da die Chlorsubstitution Veränderungen der Gewebespezifität und der Permeabilität bewirken kann, sind bessere pharmakodynamische Eigenschaften von Chloractinomycinen denkbar.

Die natürlichen Chloractinomycine aus Tü 39 und Tü 61 wurden hier nur soweit bearbeitet, daß ihre Herstellung in großem Maßstab möglich ist. Die weitere Bearbeitung dieser Substanzen hat die Arbeitsgruppe von Professor Dr. E. Katz, Georgetown University, Washington D.C., USA, übernommen, der sich schon seit zwanzig Jahren mit Actinomycinen, insbesondere ihrer Biosynthese (Katz, 1968) beschäftigt.

4.2.2. Chlorisoflavone

Während Flavonstrukturen im ganzen Pflanzenreich verbreitet sind und auch bei Pilzen gefunden wurden, kommen Isoflavonoide ausschließlich bei Leguminosen vor (Swain, 1975). Abbildung 15 zeigt die Isoflavone, die als 7-Glucoside im Sojamehl vorkommen und von Tü 6 umgesetzt werden.

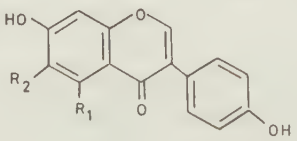


Abbildung 15: Isoflavone aus Sojamehl

Genistein: R_1 = OH, R_2 = H
Daidzein : R_1 = H , R_2 = H
Glycitein: R_1 = H , R_2 = OCH_3

Die Isoflavonoide zeichnen sich unter den Flavonoiden auch durch vielfältige biologische Wirkungen aus: es gibt darunter Substanzen mit östrogenen, insektiziden und antifungischen Eigenschaften (Wong, 1975). Wie andere Isoflavone können Genistein und Daidzein aufgrund der östrogenen Wirkung zur Infertilität von Schafen führen, die sich von Leguminosen ernähren. Für Genistein und einige andere Isoflavone fanden Umezawa et al. (1975) eine Hemmung der Bindung von Östradiol an sein Uterusrezeptorprotein.

Eine Reihe von Flavonoiden zeigt antifungische Wirkung (Honma, 1976; Van Etten, 1976), vor allem das einzige natürliche chlorhaltige Flavon, Chlorflavonin, aus Aspergillus candidus (Richards et al., 1969). In manchen Leguminosen wird die Isoflavonoidbildung bei Pilzinfektionen induziert; solche Substanzen werden Phytoalexine genannt. Bei Cajanus cajan nimmt z.B. auch der Genisteingehalt des Pflanzengewebes nach Infektion mit Helminthosporium carbonum zu (Ingham, 1976). Auf Lupinenblättern findet man auch ohne vorangegangene Infektion Luteon, ein Isoflavon, das an C-6 eine Isopentenylgruppe trägt. Es hemmt das Wachstum von Helminthosporium carbonum in viel geringeren Konzentrationen als entsprechende Verbindungen ohne den Substituenten an C-6 (Harborne et al., 1976). Die erhöhte Wirkung könnte nach Ansicht der Autoren auf eine verbesserte Lipidlöslichkeit zurückzuführen sein. Der gleiche Effekt würde auch die stärkere Wirkung der Chlorgenisteine gegenüber der chlorfreien Substanz erklären.

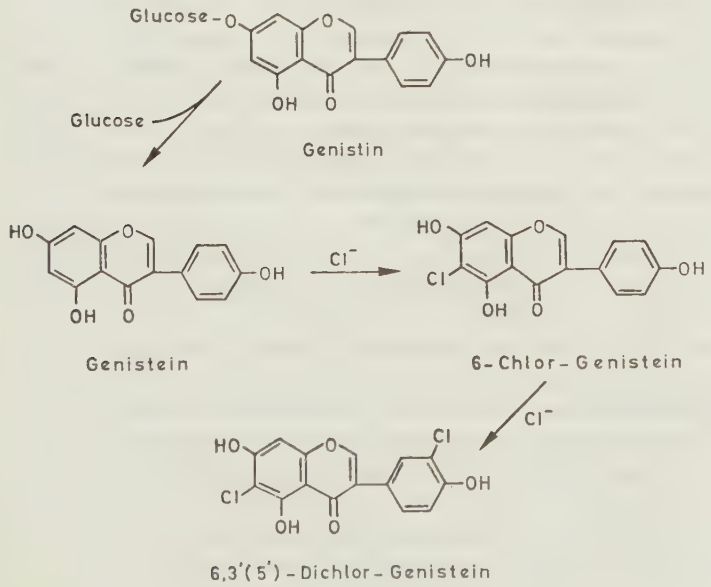
Der wohl interessanteste Aspekt ist die neurdings entdeckte blutdrucksenkende Wirkung einiger Isoflavone (Chimura et al., 1975; Umezawa et al., 1975; Tobe et al., 1976). Sie wurden bei einem Screening auf Inhibitoren von Enzymen gefunden, die an der Bildung und Inaktivierung von Noradrenalin und Adrenalin beteiligt sind: DOPA-Decarboxylase und Catechol-O-Methyltransferase. Diese Isoflavone werden von Aspergillus niger und verschiedenen Streptomyceten auf

sojamehlhaltigen Nährlösungen gebildet, so daß die Wahrscheinlichkeit groß ist, daß es sich hier ebenfalls um Transformationen der Isoflavone aus Sojamehl handelt. Auch Genistein war unter den isolierten Substanzen und zeigte eine Hemmung der genannten Enzyme.

Für eine pharmakologische Prüfung der Chlorgenisteine soll genügend Material bereitgestellt werden.

4.3. Chlorierung als mikrobielle Transformation

In Schema 2 ist die Umsetzung des Genistins, des Glucosids von Genistein, durch Tü 6 dargestellt, wie sie sich aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt.



Schema 2: Transformationen von Genistin durch Tü 6

Zunächst wird das Glucosid hydrolysiert, dann wird das Aglycon in zwei Schritten chloriert.

Die Substanzen werden noch weiter metabolisiert, wie die Abnahme der Radioaktivität in den Extrakten (Abbildung 12 und 13) zeigt, aber nur die einfachen chlorierten Derivate wurden isoliert, weil sie in den ersten drei Tagen die Hauptkomponenten sind. Danach kann man zwölf chlorierte Substanzen unterscheiden (Tabelle 2). Das könnte bedeuten, daß die Chlorierung an verschiedenen Substraten, also unspezifisch, erfolgt; die Verbindungen können aber auch sehr ähnlich sein und es ist nicht auszuschließen, daß sie sich alle von den Isoflavonen ableiten.

Weil das Substrat von Tü 6 nicht selbst synthetisiert wird, ist die Hydrolyse und Chlorierung von Genistin als mikrobielle Transformation anzusehen. Eine umfassende Übersicht solcher Reaktionen gibt Kieslich (1976). Sie geben nicht nur Aufschluß über den Stoffwechsel der betreffenden Organismen, sie haben auch die Herstellung vieler Präparate vereinfacht und verbilligt. Hydroxylierungen, insbesondere von Steroiden, haben große Bedeutung (Charney und Herzog, 1967). Aber auch Antibiotika werden nicht nur chemisch, sondern auch biologisch modifiziert, um neuartige Wirkungen zu erzielen (Kurylowicz et al., 1976).

Bislang spielen Halogenierungen unter den mikrobiellen Transformationen keine große Rolle, obwohl sie nach den in der Einleitung genannten pharmakologischen Effekten der Chlorsubstitution interessant sein dürften. Die Chemiker machen sich diese Effekte oft zunutze; die Verbesserung der Lincomycinwirkung durch Chlorsubstitution wurde bereits genannt. Die 9α-Chlorsubstitution erhöht die Wirkung von Cortison und Cortisol (Korolkovas, 1974). Eine 17α-Chlorierung von Ketoprogesteron ist mit dem Pilz Caldariomyces fumago gelungen (Neidleman et al., 1969), außerdem auch die Bromierung an verschiedenen Po-

sitionen, auch in 9α-Stellung. Dies ist der einzige Mikroorganismus, mit dem Substrate chloriert wurden, die sich von seinem natürlichen wesentlich unterscheiden. Caldariomyces bildet das chlorierte Cyclopentandiol, Caldariomycin, kann aber auch Ketosäuren, substituierte Phenole und Thioverbindungen chlorieren. Außerdem sind auch Bromierungen und Jodierungen möglich (Beckwith und Hager, 1963; Hager et al., 1966). Die Aufklärung des Chlorierungsmechanismus und die Isolierung des verantwortlichen Enzyms war bei diesem Stamm begünstigt durch das relativ einfache Substrat, das durch das leicht zugängliche Homologe, Dimedon, ersetzt werden konnte (Hager et al., 1975; DiNello et al., 1975; Chiang et al., 1976).

Bei Bakterien ist es bisher nicht gelungen, einen Chlorierungsmechanismus zu klären. Der Halogenierungsschritt in der Biosynthese von Chloramphenicol und Chlortetracyclin ist untersucht worden; er ist nicht der letzte Schritt in der Biosynthese und bei Chloramphenicol ist nicht einmal das Substrat der Chlorierung bekannt (Gottlieb, 1967). Die Untersuchung einzelner Biosyntheseschritte ist nur möglich, wenn Mutanten mit einem Block in der Biosynthese zur Verfügung stehen oder wenn Folgeschritte chemisch blockiert werden können. Auf diese Weise ist bei Chlortetracyclin das Substrat der Chlorierung festgestellt worden (McCormick, 1967).

Mit Tü 6 hat man bei Bakterien einen ähnlich einfachen Fall wie bei Caldariomyces. In synthetischen Medien ist die Chlorierung eines Substrats für sich zu untersuchen und das Substrat ist verhältnismäßig leicht zugänglich. Es ist denkbar, daß auch einfachere Phenole chloriert werden.

4.4. Chlorstoffwechsel

Zunächst überraschte die Tatsache, daß rund 10 von 100 Streptomyceten zur Chlorierung in der Lage sind. Dabei waren die Bedingungen im Screening nicht besonders günstig: das Medium war chloridarm, um einen guten Einbau von ^{36}Chlor zu erhalten, die Belüftung war schlecht, weil der Test in Reagenzgläsern durchgeführt wurde und mit der Extraktion beschränkte man sich auf lipophile Verbindungen. Man kann daher annehmen, daß die Zahl chlorierender Mikroorganismen noch größer ist.

Früher wurden chlorhaltige Naturstoffe für eine Rarität gehalten (Petty, 1961), die Zahl solcher Produkte aus Mikroorganismen ist inzwischen auf über 100 angestiegen (Turner, 1971; Strunz, 1973) und laufend werden neue beschrieben. Zudem hat man inzwischen bei Algen, vornehmlich bei Rotalgen, halogenierte Produkte gefunden. Einige reichern Halogene in speziellen Zellen an, andere lagern vor allem bromierte Verbindungen bis zu 5 % ihres Trockengewichts ein; sie sind dann als Zelleinschlüsse sichtbar (Fenical, 1975). Bei einem Phytoflagellaten sind mehrfach chlorierte Lipide sogar Strukturelemente: sie sind Bestandteil der Flagellarmembran (Chen et al., 1976).

Bei dieser Vielzahl an halogenierten Substanzen müssen auch Abbaumechanismen vorhanden sein, denn zumindest von den Algen weiß man, daß sie diese Verbindungen in ihrer natürlichen Umgebung produzieren.

Die Probleme mit der Persistenz chlorierter Verbindungen, vor allem der Pestizide, haben verschiedentlich zur Suche nach abbauenden Mikroorganismen geführt (Wright, 1974; Peakall, 1975; Tu und Miles, 1976), und man kennt Mikroorganismen, die chlorierte Verbindungen in Submerskultur umsetzen. Solche Organismen wurden aus Bodenproben unter Zusatz von Pestiziden selektioniert; im Boden sind sie

wahrscheinlich nur selten und haben dort auch nicht die optimalen Bedingungen wie in Kultur. Im Abwasser lassen sich geeignete Bedingungen schaffen, dort ist der biologische Abbau chlorierter Verbindungen deshalb eher denkbar.

Auch höhere Organismen können unter Umständen solche Substanzen abbauen. Einige Insekten besitzen ein Enzym, die DDT-Dehydrochlorinase, die in Gegenwart von Glutathion Chlorid aus dem Trichloräthylrest von DDT abspaltet und damit das Insektizid inaktiviert (Dinamarca et al., 1969).

Die meisten Pharmaka, die Chlor enthalten, verlassen den Körper auch wieder in chlorierter Form (Beyer, 1975), vor allem chlorierte aromatische Verbindungen widersetzen sich dem Abbau. Dagegen können aliphatische Substanzen dechloriert werden. Chlorierte Fettsäuren, wie sie in gebleichtem Mehl enthalten sind, verlieren in der Rattenleber ihr Chlor als Chlorid (Cunningham und Lawrence, 1976).

So stellt sich allmählich heraus, daß Chlor in der Natur einem viel größeren Stoffwechsel unterliegt als früher angenommen wurde. Es hat offenbar nicht nur als Anion Bedeutung.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Unter elf Stämmen, die mit einem Screening auf chlorhaltige Metabolite von Streptomyceten gefunden wurden, fielen zwei auf, weil ihre Produkte besonders leicht zu charakterisieren waren.

Der eine Stamm, Streptomyces fradiae Tü 39, bildet ein gelbes chlorhaltiges Antibiotikum, das von Bergmann (1975) als Actinomycin der Z-Gruppe identifiziert wurde. Es ist das erste natürliche chlorhaltige Actinomycin, das man kennt.

Sechs weitere Actinomycinproduzenten wurden auf chlorhaltige Komponenten untersucht und eine zweite bei Streptomyces tendae Tü 61 gefunden. Die beiden Chloractinomycine wurden verglichen und soweit bearbeitet, daß sie in großem Maßstab fermentiert werden können.

Der zweite Stamm aus dem Screening, Streptomyces griseus Tü 6, bildet in erster Linie vier chlorhaltige Substanzen, die als Isoflavone identifiziert wurden. Natürliche chlorhaltige Isoflavone sind bisher nicht beschrieben. Isoflavone sind nur aus Leguminosen bekannt. Die verwendete Nährlösung enthielt Sojamehl, und es konnte gezeigt werden, daß Tü 6 die Isoflavone aus Sojamehl umsetzt. Sie sind dort als Glucoside enthalten, die von Tü 6 hydrolysiert und chloriert werden.

Die Struktur der beiden Hauptkomponenten wurde aufgeklärt; es handelt sich um 6-Chlorgenistein und 6,3'(5')-Dichlorgenistein.

Im Sojamehl sind außer dem Genisteinglucosid noch die Glucoside von Daidzein und Glycitein enthalten. Es ist wahrscheinlich, daß die beiden anderen Komponenten chlorierte Derivate dieser Verbindungen sind.

Die optimalen Bedingungen für die Chlorierung der Isoflavone wurden ermittelt und die Aufarbeitung verbessert.

Die schwach antibiotische Wirkung des Genisteins wird durch die Chlorierung etwas erhöht.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Aoyagi, T.; T. Hazato, M. Kumagai, M. Hamada, T. Takeuchi and H. Umezawa: Isoflavone rhamunosides, inhibitors of β-galactosidase produced by Actinomycetes. J. Antibiotics 28, 1006 - 1008 (1975)

Arai, T; K. Yazawa and Y. Mikami: Isolation and characterization of satellite antibiotics, mimosamycin and chlorocarcins from Streptomyces lavendulae, streptothricin source. J. Antibiotics 29, 398 - 407 (1976)

Audier, H.: Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. Bull. Soc. Chim. France 1966, 2892 - 2899

Barz, W. and W. Hösel: Metabolism of flavonoids. In: The flavonoids. Eds.: J.B. Harborne, T.J. Mabry and H. Mabry, Chapman and Hall, London, 1975

Beckwith, J.R. and L.P. Hager: Biological chlorination. VIII. Late intermediates in the biosynthesis of caldariomycin. J. B. C. 238, 3091 - 3095 (1963)

Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1974)

Bergmann, W.: Untersuchung eines chlorhaltigen Actinomycins aus Streptomyces fradiae. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1975)

Beyer, K.H.: Biotransformationen der Arzneimittel. Wissensch. Verlagsgesellschaft. Stuttgart, 1975

Bossi, R.; R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp und H. Zähner: Actinomycin Z. Helv.chim. Acta 41 (6), 1645 - 1652 (1958)

Brockmann, H.; J. Ammann, and W. Müller: 7-Chlor- and 7-brom actinomycine. Tetrahedron Letters 30, 3595 - 3597 (1966)

Charney, W. and H.L. Herzog: Microbial transformations of steroids. A handbook. Academic Press, New York, London, 1967

Chen, L.L.; M. Pousada, T.H. Haines: The flagella membrane of Ochromonas danica. Lipid composition. J. B. C. 251 (6), 1835 - 1842 (1976)

Chiang, R.; T. Rand-Meir, R. Makino and L.P. Hager: Compound X. An intermediate in enzymatic halogenation. J. B. C. 251 (20), 6340 - 6346 (1976)

Chimura, H.; T. Sawa, Y. Kumada, H. Naganawa, M. Matsuzaki, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi and H. Umezawa: New isoflavones, inhibiting catechol-O-methyltransferase, produced by Streptomyces. J. Antibiotics 28, 619 - 626 (1975)

Chivers, C.P.: Chlorine and chlorine compounds in public health and medicine. Chem. Ind. 1975, 247 - 249

Cunningham, H.M. and G.A. Lawrence: A comparison of the distribution and elimination of oleic and chlorinated oleic acids and their metabolides in rats. Food Cosmetics Toxicol. 14 (4), 283 - 288 (1976)

Dähn, U.: Reinigung und Untersuchungen zur Strukturaufklärung von drei Antibiotika. Dissertation, Universität Tübingen (1975)

Dinamarca, M.L.; I. Saavedra and E. Valdés: DDT-Dehydrochlorinase-I. Purification and characterization. Comp. Biochem. Physiol. 31, 269 - 282 (1969)

DiNello, R.K.; K. Rousseau and D. Dolphin: A model for the halogenating agent of chloroperoxidase. Ann. New York Acad. Sci. 244, 94 - 106 (1975)

Drautz, H.: Lysolipin I, ein neues Antibiotikum aus Streptomyces violaceoniger. Dissertation, Universität Tübingen (1975)

Farber, S. and A.T. Mitus: Role of actinomycin D in pediatric oncology. In: Actinomycin; nature, formation, and activities. Ed.: S.A. Waksman, Interscience Publishers, New York, London, Sidney, 1968

Fickenscher, U.: Isolierung und Wirkungsweise von L-2,5-Dihydrophenylalamin, ein Antibiotikum aus Streptomyceten. Dissertation, Universität Tübingen, 1970

Fenical, W.: Halogenation in the Rhodophyta - a review. J. Phycology 11 (3), 245 - 259 (1975)

Fiedler, H.-P.: Persönliche Mitteilung. Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen, 1977

Gottlieb, D.: Chloramphenicol. In: Antibiotics II. Biosynthesis. Eds.: D. Gottlieb and P. Shaw. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967

Hackmann, Ch.: Action of actinomycin in experimental tumors. In: Actinomycin; nature, formation, and activities. Ed.: S.A. Waksman, Interscience Publishers, New York, London, Sidney, 1968

Hager, L.P.; D.R. Morris, F.S. Brown and H. Eberwein: Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. J. B. C. 241 (8), 1769 - 1777 (1966)

Hager, L.P.; P.F. Hollenberg, T. Rand-Meir, R. Chiang and D. Doubek: Chemistry of peroxidase intermediates. Ann. New York Acad. Sci. 244, 80 - 93 (1975)

Hahn, F.E.: Chloramphenicol. In: Antibiotics. I. Mechanism of action. Eds.: D. Gottlieb and P.D. Shaw. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967

Hanka, L.J.; S.A. Gerpheide, P.R. Spieles, D.G. Martin, P.A. Belter, T.A. Coleman and H.F. Meyer: Improved methods for production, isolation, and assay of two new chlorisoxazolin amino acid antitumor antimetabolites: U-42, 126 and U-43, 795. Antimicrobial Agents and Chemother. 7 (6), 807 - 810 (1975)

Harborne, J.B.; J.L. Ingham, L. King and M. Payne: The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectional antifungal agent in the genus Lupinus. Phytochemistry 15, 1485 - 1487 (1976)

Honma, Y.; Y. Arimoto and T. Misato: Flavonoid fungicides. Japan Kokai 75, 111, 230 (Cl.A01N) 1. Sep. 1975, Appl. 7419, 822, 19. Feb. 1974. Aus C.A. 84 (3), 133 (Nr. 13498c) (1976)

Hollstein, U.: Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. Chem. Rev. 74, 625 - 652 (1974)

Huber, F.M.: Griseofulvin. In: Antibiotics III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. Eds.: J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975

Hütter, R.; W. Keller-Schierlein, J. Nüesch und H. Zähner: Scopamine. Arch. Mikrobiol. 51, 1 - 8 (1965)

Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten. Bibl. Microbiol. 6. Basel: Karger (1967)

Ingham, J.L.: Induced isoflavonoids from fungus-infected stems of Pigeon Pea (Cajanus cajan). Z. Naturforschung 31, 504 - 508 (1976)

Jordan, D.L. and P.E. Reynolds: Vancomycin. In: Antibiotics. III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. Eds.: J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975

Karnofsky, D.A.: The use of actinomycin in neoplastic disease in adults. In: Actinomycin; nature, formation, and activities. Ed.: S.A. Waksman, Interscience Publishers, New York, London, Sidney, 1968

Katz, E.: Biogenesis of the actinomycins. Ibidem

Kavanagh, F.: Analytical microbiology. Academic Press New York, London, 1963

Kieslich, K.: Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds. Thieme, Stuttgart, 1976

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation, Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1971)

Korolkovas, A.: Grundlagen der molekularen Pharmakologie. Thieme, Stuttgart, 1974

Krauß, Ch.: Chlorhaltige Substanzen aus Actinomyceten. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1974)

Kurylowicz, W.; W. Chojonowski, K. Raczynska-Bojanowska and Z. Kowszyk-Gindifer: Antibiotics - a critical review. Polish Medical Publishers, Warszawa, 1976

Kuschinsky, G. und H. Lüllmann: Kurzes Lehrbuch der PHarmakologie. Thieme, Stuttgart, 1972

Laskin, A.L.: Tetracyclines. In: Antibiotics I. Mechanism of action. Eds.: D. Gottlieb and P. Shaw. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967

Lemke, J.: Arenaemycin, ein Antibiotikum aus Streptomyceten. Untersuchungen zur Isolierung, Identifizierung und Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1971)

Loeffler, W.: Persönliche Mitteilung. Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen, 1977

Mabry, T.J.; K.R. Markham and M.B. Thomas: The systematic identification of flavonoids. Springer, New York, 1970

MacMillan, J.: Griseofulvin. Part IX. Isolation of the bromoanalogue from Penicillium griseofulvum and Penicillium nigricans. J. Chem. Soc. 1954, 2585 - 2587

Magerlein, B.J.; R.D. Birkenmeyer and F. Kagan: Chemical modification of lincomycin. Antimicrobial Agents and Chemother. 1966, 727 - 736

Mason, K.T. and E. Katz: Branched-chain amino acid substitutions in the biosynthesis of the antibiotic actinomycin. Antimicrobial Agents and Chemother. 7 (6), 773 - 780 (1975)

McCormick, J.R.D.: Tetracycline. In: Antibiotics II. Biosynthesis. Eds.: D. Gottlieb and P. Shaw. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967

Meienhofer, J. and E. Atherton: Structure-activity relationships in the actinomycins. Adv. Appl. Micr. 16, 203 - 300 (1973)

Meyers, F.H.; E. Jawetz und A. Goldfien: Lehrbuch der Pharmakologie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975

Moore, S.; M. Kondo, M. Copeland, J. Meienhofer and R.K. Johnson: Synthesis and antitumor activity of 2-deamino- and N^2-(γ-hydroxipropyl)-actinomycin D. J. Med. Chem. 18 (11), 1098 - 1101 (1975)

Naim, M.; B. Gestetner, I. Kirson, Y. Birk and A. Bondi: A new isoflavone from soya beans. Phytochem. 12, 169 - 170 (1973)

Neidleman, S.L.; A.I. Cohen and L. Dean: Enzymatic bromination of the thiazole ring. Biotech. Bioeng. 11, 1227 - 1232 (1969)

Peakall, D.B.: PCB's and their environmental effects. Crit. Rev. Environ. Control 5 (4), 469 - 508 (1975)

Pestka, S.: Chloramphenicol. In: Antibiotics III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. Eds.: J.W. Corcoran and F.E. Hahn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation, Universität Tübingen (1967)

Petty, M.A.: An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites. Bact. Rev. 25, 111 - 130 (1961)

Reedy, R.J.; W.A. Randall and H. Welch: Variations in the antimicrobial activity of the tetracyclines. II. Antibiot. and Chemother. 5 (3), 115 - 123 (1955)

Richards, M.; A.E. Bird and J.E. Munden: Chlorflavonin. A new antifungal antibiotic. J. Antibiotics 22, 388 - 389 (1969)

Ringrose, P.S. and R.W. Lambert: The action of novel chloramphenicol analogues on prokaryotic and eukaryotic systems. B. B. A. 299, 374 - 384 (1973)

Santo, L.: Suche nach Antibiotika mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien, Tirandamycin A und B. Dissertation Universität Tübingen (1976)

Schwartz, H.S.; S.S. Sternberg and F.S. Philips: Selective cytotoxicity of actinomycin in mammals. In: Actinomycin; nature, formation, and activities. Ed.: S.A. Waksman, Interscience Publishers, New York, London, Sidney, 1968

Strunz, G.M.: Microbial chlorine-containing metabolites. In: Handbook of mircrobiology, III. CRC Press, Cleveland, 1973

Swain, T.: Evolution of flavonoid compounds. In: The flavonoids. Eds.: J.B. Harborne, T.J. Mabry and H. Mabry. Chapman and Hall, London, 1975

Tobe, H.; H. Naganawa, T. Takita, T. Takeuchi and H. Umezawa: Structure of a new isoflavone from fungi and Streptomyces inhibiting DOPA decarboxylase. J. Antibiotics 29 (6), 623 - 625 (1976)

Tu, C.M. and J.R.W. Miles: Interactions between insecticides and soil micorbes. Res. Rev. 64, 17 - 65 (1976)

Turner, W.B.: Fungal metabolites. A.P. New York, London, 1971

Umezawa, H.; H. Tobe, N. Shibamoto, F. Nakamura, K. Nakamura, M. Matsuzaki and T. Takeuchi: Isolation of isoflavones inhibiting DOPA decarboxylase from fungi and Streptomyces. J. Antibiotics 28 (12), 947 - 952 (1975)

Van Etten, H.D.: Differential sensitivity of fungi to pisatin and to phaseollin. Phytopathol. 63, 1477 - 1482 (1973)

Van Etten, H.D.: Antifungal activity of pterocarpans and other selected isoflavonoids. Phytochem. 15 (5), 655 - 659 (1976)

Wagman, G.H.; J.A. Marquez, P.D. Watkins, F. Gentile, A. Murawski, M. Patel and M.J. Weinstein: A new actionomycin complex produced by a Micromonospora species: fermentation, isolation, and characterization. Antimicrobial Agents. Chemother. 9 (3), 465 - 469 (1976)

Wolf, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30S-Untereinheit. Dissertation, Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1971)

Wong, E.: Isoflavonoids. In: The flavonoids. Eds.: J.B. Harborne, T.J. Mabry and H. Mabry. Chapman and Hall, London, 1975

Woodruff, H.B. and S.A. Waksman: Production and isolation. In: Actinomycin; nature, formation, and activities. Ed.: S.A. Waksman, Interscience Publishers, New York, London, Sidney, 1968

Wright, S.J.L.: Microbial breakdown of agricultural organochemicals, especially herbicides. In: Industrial aspects of biochemistry. Ed.: B. Spencer, North Holland, American Elsevier, 1974

Zähner, H.; R. Hütter und E. Bachmann: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. Nr. 23. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. 36, 325 - 349 (1960)

Zähner, H.: Einige Aspekte der Antibiotikaforschung. Vortrag. Berlin, Fifth International Fermentation Symposium, 1976. Angewandte Chemie, im Druck

Lebenslauf

09. 01. 1947	geboren in Calw
1953 - 1957	Volksschule in Bad Liebenzell
1957 - 1966	Gymnasium Calw
18. 02. 1966	Reifeprüfung am Gymnasium Calw
ab SS 1966	Biochemiestudium an der Universität Tübingen
26. 09. 1967	Diplomvorprüfung, Teil 1
14. 04. 1970	Diplomvorprüfung, Teil 2
29. 05. 1974	Diplomhauptprüfung in Biochemie mit Wahlfach Mikrobiologie

anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I unter der Anleitung von Professor Dr. H. Zähner.

Meine akademischen Lehrer waren

M.Baumann
E.Bayer
W.Beermann
F.Bonhoeffer
V.Braun
E.Breitmaier
E.Bünning
W.Bues
H.Diekmann
D.Dütting
U.Feine
A.Gottschalk
K.G.Grell
J.Guglielmi
H.Hagenmaier
K.Heckmann
U.Henning
E.Kallee
H.Krüger
H.Mauser
H.Metzner
G.Meyer
K.Mörike
E.Müller
K.W.Mundry
G.Opitz
H.Pape
K.Pelling
H.Probst
A.Rieker
W.Rüdorff
H.E.Schaller
F.Schneider
W.Schweizer
W.Seyffert
H.B.Strack
E.Stumpp
H.Wenck
A.Wendel
U.Weser
G.Weitzel
K.Wöhrmann
H.Zähner